

Aus dem Physiologischen Institut  
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Markus Bleich)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

EINFLUSS DES  *$\beta$ -site-APP-cleaving enzyme 1* (BACE1)  
AUF KALIUM-KANÄLE DER KCNQ-FAMILIE UND  
DEREN INTERAKTION MIT  $\beta$ -UNTEREINHEITEN DER  
SPANNUNGSABHÄNGIGEN NATRIUM-KANÄLE

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**MATTHIAS NISSEN**  
aus Husum

Kiel 2011

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. C. Alzheimer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. T. Herdegen

Tag der mündlichen Prüfung:

25.03.2011

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 25.03.2011

gez.

---

(Prof. Dr. Dr. Cascorbi, Vorsitzender d.Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einführung</b>	- 1 -
1.1 Zelluläre Membranen und Membranpotentiale	- 1 -
1.2 Spannungsabhängige Kationenkanäle	- 2 -
1.2.1 Spannungsabhängige Natriumkanäle	- 3 -
1.2.2 Spannungsabhängige Kaliumkanäle der KCNQ-Familie	- 5 -
1.2.2.1 KCNQ2- und KCNQ3-Kanäle erzeugen den neuronalen M-Strom	- 5 -
1.2.2.2 KCNQ1- und KCNE1-Kanäle erzeugen den kardialen $I_{Ks}$ -Strom	- 8 -
1.2.3 Ionenkanäle und die Alzheimer'sche Demenz	- 8 -
1.3 Morbus Alzheimer	- 9 -
1.3.1 Pathologie der AD	- 9 -
1.3.1.1 BACE1 als initialer Pathogenitätsfaktor der AD	- 10 -
1.3.1.2 Das $\beta$ -site-APP-cleaving enzyme 1 (BACE1)	- 12 -
1.3.2 Physiologische Substrate und Funktion der BACE1	- 13 -
1.4 Fragestellung	- 16 -
<b>2. Material und Methoden</b>	- 17 -
2.1 Eukaryotische Zellkulturen	- 17 -
2.1.1 HEK293-Zellen	- 17 -
2.1.2 N1E-115-Zellen	- 17 -
2.1.3 Kultur	- 18 -
2.1.4 Einfrieren	- 18 -
2.1.5 Auftauen	- 19 -
2.1.6 Aussaat	- 19 -
2.1.7 Nährmedium	- 19 -
2.1.8 Zellzählung	- 19 -
2.2 Molekularbiologie	- 20 -
2.2.1 Vektoren und Bakterien	- 20 -
2.2.2 Bakterienklonierung und Isolierung von Plasmid-DNA	- 21 -
2.2.2.1 Transformation und Bakterienklonierung	- 21 -
2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA	- 21 -
2.2.3 Transiente Transfektionen	- 22 -
2.2.4 Compound 3	- 23 -
2.3 Elektrophysiologie	- 23 -
2.3.1 Patch Clamp Technik	- 23 -
2.3.2 Patch-Clamp Setup	- 25 -

2.3.2.1 Störfaktoren .....	- 26 -
2.3.2.2 Verstärker und Software .....	- 26 -
2.3.2.3 Mikroskop .....	- 27 -
2.3.2.4 Filament .....	- 28 -
2.3.2.5 Pipetten .....	- 29 -
2.3.2.6 Elektroden .....	- 29 -
2.3.2.7 Klimaanlage .....	- 29 -
2.4 Versuchsablauf .....	- 30 -
2.4.1 Zellpräparation .....	- 30 -
2.4.2 Pipettenfüllung .....	- 30 -
2.4.3 Zellauswahl .....	- 30 -
2.4.4 Erreichen eines Gigaseals .....	- 31 -
2.5 Messlösungen .....	- 33 -
2.6 Auswertung .....	- 34 -
2.7 Elektrophysiologische Parameter .....	- 35 -
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>- 37 -</b>
3.1 Effekte von BACE1 auf $\text{Na}_v$ -Ströme in N1E-115 Zellen .....	- 37 -
3.1.1 BACE1 beeinflusst die Natriumkanalaktivierung .....	- 37 -
3.1.2 BACE1 hat keinen Einfluß auf die Natriumkanalinaktivierung .....	- 39 -
3.1.3 BACE1 beeinflusst die Erholung der Natriumkanäle von der Inaktivierung .....	- 40 -
3.2 Stromcharakteristika spannungsgesteuerter KCNQ2- und KCNQ3-Kanäle .....	- 42 -
3.3 Einfluss von $\text{Na}_v$ $\beta$ 2- und $\beta$ 4-Untereinheiten auf KCNQ2- und KCNQ3-Ströme in HEK293-Zellen .....	- 46 -
3.3.1 Einfluss von $\text{Na}_v$ $\beta$ 2-Untereinheiten auf heteromere KCNQ2/3-Kanäle .....	- 47 -
3.3.2 Einfluss von $\text{Na}_v$ $\beta$ 2-Untereinheiten auf homomere KCNQ2- und KCNQ3-Ströme .....	- 48 -
3.3.3 Einfluss von $\text{Na}_v$ $\beta$ 4-Untereinheiten auf heteromere KCNQ2/3-Kanäle .....	- 50 -
3.4 BACE1 beeinflusst die Interaktionen zwischen KCNQ2- und KCNQ3-Kanälen mit $\text{Na}_v$ $\beta$ 2- und $\beta$ 4-Untereinheiten in HEK293-Zellen .....	- 51 -
3.4.1 BACE1-Effekte auf die Stromparameter heteromerer KCNQ2/3-Kanäle unter Einfluss von $\text{Na}_v$ $\beta$ 2 und $\beta$ 4 .....	- 52 -
3.4.2 BACE1-Effekte auf die Stromparameter homomerer KCNQ2-Kanäle unter Einfluss von $\text{Na}_v$ $\beta$ 2 .....	- 56 -
3.5 BACE1-Effekte auf die Stromparameter heteromerer KCNQ2/3-Kanäle unter Einfluss von $\text{Na}_v$ $\beta$ 2 in N1E-115 Zellen .....	- 57 -
3.6 Effekt von BACE1 auf den kardialen $I_{\text{KS}}$ -Strom in HEK293-Zellen .....	- 60 -
3.6.1 BACE1 bewirkt eine Rechtsverschiebung der KCNQ1/E1-Aktivierung .....	- 60 -

3.6.2 BACE1 hat keinen Einfluss auf die Zeitkonstanten der KCNQ1/E1-Ströme.....	- 62 -
3.6.3 BACE1 hat keinen Einfluss auf die Stromdichten der KCNQ1/E1-Kanäle.....	- 63 -
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>- 64 -</b>
4.1 Die Natriumkanalaktivierung und deren Erholung von der Inaktivierung wird durch BACE1 moduliert .....	- 64 -
4.2 KCNQ2/3-Kanäle interagieren mit Na <sub>v</sub> β2-Untereinheiten und werden dabei durch BACE1 beeinflusst .....	- 66 -
4.3 Synergistische Interaktionen der Na <sub>v</sub> β4-Untereinheiten und BACE1 mit KCNQ2/3-Kanälen. -	69 -
4.4 Fraglicher Einfluss von Na <sub>v</sub> β2-Untereinheiten und BACE1 auf homomere KCNQ2- und KCNQ3-Kanäle .....	- 70 -
4.5 Gemeinsame Abhängigkeiten der spannungsabhängigen Aktivierung von Na <sub>v</sub> 1.2 und KCNQ2/3 .....	- 70 -
4.6 BACE1 moduliert die spannungsabhängige Aktivierung von KCNQ1/E1 .....	- 71 -
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>- 74 -</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>- 76 -</b>
<b>7. Anhang und Verzeichnisse.....</b>	<b>- 90 -</b>
7.1 Tabellenanhang .....	- 90 -
7.2 Abkürzungsverzeichnis.....	- 92 -
7.3 Danksagung .....	- 94 -
7.4 Lebenslauf .....	- 95 -



## 1. Einführung

### 1.1 Zelluläre Membranen und Membranpotentiale

Vor mehr als drei Milliarden Jahren bildeten die ersten einzelligen Lebensformen biologische Membranen aus (Deamer und Oro, 1980; Deamer, 1997; Deamer et al., 2002). Die hierdurch erfolgte Kompartimentisierung und Abgrenzung gegenüber der Umwelt ist für die Autonomie und die individuelle Funktionalität einer jeden Zelle von essentieller Bedeutung (Tawfik und Griffiths, 1998; Hille, 2001). Hauptbestandteil eukaryotischer Plasmamembranen sind doppelschichtig angeordnete, amphipathische Lipidmoleküle, deren hydrophilen Phasen dem wässrigen Milieu und lipophilen Phasen dem Inneren der Lipiddoppelschicht zugewandt sind. Da die Plasmamembran für polare Moleküle und Ionen weitestgehend impermeabel ist, bedarf es spezifischer molekularer Pumpen und Kanäle, um die zytosolische Molekül- und Ionenzusammensetzung zu regulieren.

Die intra- und extrazellulären  $K^+$ -Ionenkonzentration stehen in den meisten erregbaren Zellen unter physiologischen Bedingungen im Verhältnis 35-40:1 ( $K^+_{\text{intern}} = 155 \text{ mM}$  vs.  $K^+_{\text{extern}} = 4 \text{ mM}$ ). Umgekehrt verhält es sich für die  $Na^+$ -Ionenkonzentration ( $Na^+_{\text{intern}} = 12 \text{ mM}$  vs.  $Na^+_{\text{extern}} = 145 \text{ mM}$ , [1:12]; Hille, 2001).

Diese Ionenverteilung wird unter Verbrauch von Energie, vornehmlich durch die elektrogene  $Na^+/K^+$ -ATPase, aufrecht erhalten. Jede Ionenart ist durch den so entstandenen elektrochemischen Gradienten zwei spezifischen Kräften ausgesetzt: einer chemischen, entlang des Konzentrationsgradienten und einer elektrischen, entlang der entstandenen Membranspannung. Beim Gleichgewichtspotential eines bestimmten Ions halten sich die auf dieses Ion wirkenden elektrostatischen und chemischen Kräfte die Waage; der Nettostrom des Ions über die Zellmembran beträgt 0 mA.

Das Ruhemembranpotential (RMP) einer neuronalen Zelle liegt mit ca. -60 bis -70 mV nahe dem Gleichgewichtspotential für Kaliumionen, d.h. es liegen mehr offene  $K^+$ -Kanäle als  $Na^+$ -Kanäle vor (RMP n. Nernst für  $K^+ = -98 \text{ mV}$ , für  $Na^+ = +67 \text{ mV}$  bei  $37^\circ \text{C}$ ; Hille, 2001; Schmidt und Lang, 2007). Daher wird das RMP hauptsächlich von Kaliumionen stabilisiert.

## 1.2 Spannungsabhängige Kationenkanäle

Ionenkanalproteine bilden in der Zellmembran hydrophile Poren aus, die den Ionen eine entlang ihres elektrochemischen Gradienten gerichtete Diffusion über die Membran ermöglichen.

Zu der Familie der spannungsabhängigen Kationenkanäle gehören unter anderem die strukturell verwandten Natrium- und Kaliumkanäle (Yu et al., 2005). Spannungsabhängige Ionenkanäle werden mit dem chemischen Symbol des Ions benannt, das sie vorwiegend permeiert (Goldin et al., 2000; Gutman et al., 2003; Catterall et al., 2005; IUPHAR-Nomenklatur [International Union of Pharmacology]).  $K_v7.1$  bzw.  $Na_v1.2$  beschreiben demzufolge einen vorwiegend für Kalium bzw. Natrium permeablen Ionenkanal, der durch die Membranspannung reguliert wird (v für voltage-gated). Die Zahlen beschreiben die Kanalfamilien ( $K_v1$  bis  $K_v12$  bzw.  $Na_v1$ ; Gutman et al., 2005; Catterall et al., 2005). Nach dem Punkt wird jeder einzelne Kanaltyp mit einer eigenen Nummer versehen (beispielsweise  $K_v7.1$  bis  $K_v7.5$  oder  $Na_v1.1$  bis  $Na_v1.9$ ).

In Abhängigkeit von der Membranspannung ändern diese strukturell verwandten Transmembranproteine ihre Ionenpermeabilität durch Öffnen oder Schließen ihrer Kanalpore. In erregbaren Zellen sind spannungsabhängige Natriumkanäle (Abschnitt 1.2.1) essentiell für die Generierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen.

Durch eine schwache Depolarisierung der Membranspannung, z.B. aufgrund eines Rezeptor-vermittelten Generatorpotentials, kommt es zu einer plötzlichen Öffnung der schnellen, spannungsgesteuerten Natriumkanäle ( $Na_v$ ), ein stark depolarisierender Natriumeinstrom wird initiiert und ein Aktionspotential entsteht. Unmittelbar nach dem Öffnen schließen sich die  $Na_v$ -Kanalporen wieder (Inaktivierung; Abschnitt 1.2.1) und durch Kaliumauswärtsströme wird die Re-/Hyperpolarisationsphase des Aktionspotentials einer Zelle eingeleitet.



### 1.2.1 Spannungsabhängige Natriumkanäle

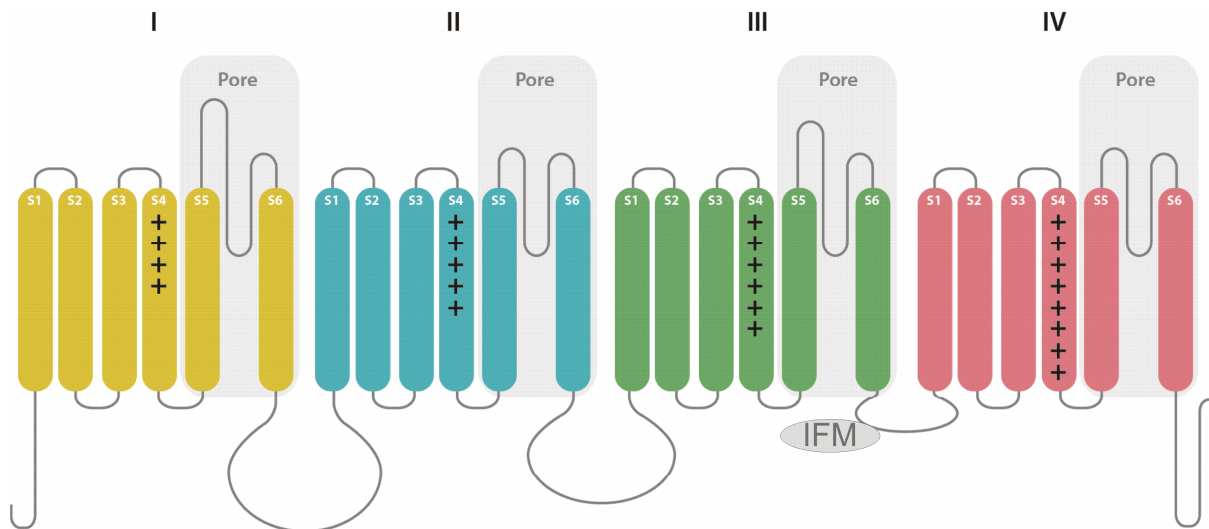


Abb. 1.1: **Topologisches Modell der α-Untereinheit eines spannungsgesteuerten Natriumkanals.** Die vier homologen Domänen (I-IV) bestehen jeweils aus sechs α-helikalen Transmembran-Segmenten (S1-6) und sind über intrazelluläre Peptidschleifen verbunden (siehe im Text). S5 und S6 bilden zusammen mit der für die Selektivität verantwortlichen Porenschleife den Permeationsweg (grau) durch die Zellmembran. Die Spannungsabhängigkeit des Kanals wird von den Segmenten S1-S4 vermittelt, die auf dem S4-Segment mehrfach positive Ladungen tragen. Zwischen den Domänen III und IV ist das für die schnelle Inaktivierung verantwortliche IFM-Motiv lokalisiert (aus Lampert et al., 2010).

**α-Untereinheiten.** Bisher sind neun α-Untereinheiten (α-Subunits) der spannungsabhängigen Natriumkanäle bekannt ( $\text{Na}_v$  1.1-1.9). Eine  $\text{Na}_v1$  α-Untereinheit (~ 250kDa) ist für die Bildung eines funktionalen Kanals ausreichend. Alle spannungsabhängigen Natriumkanäle sind aus vier homologen Domänen (D I-IV) mit jeweils sechs Transmembransegmenten (6TM; S1-S6) aufgebaut (Abbildung 1.1; Lampert et al., 2010), die untereinander durch intrazelluläre Peptidschleifen verbunden sind. In der haarnadelartigen Porenschleife zwischen S5 und S6 ist der Selektivitätsfilter für die Natriumionen lokalisiert. Zusammen mit den S5 und S6 α-Helices formt die Porenschleife die innere Wandung der ionenleitenden Pore (S5-P-S6 Sequenz). Das mit positiv geladenen, basischen Aminosäureseitenketten versehene S4-Transmembransegment dient als Spannungssensor, der Änderungen des elektrischen Feldes über der Membran detektiert. Die Segmente S1-S4 sind in der Lage, ihre Konformation als Reaktion auf ein depolarisierendes Potential dergestalt zu verändern, dass die Porenregion für Natriumionen permeabel wird. Nach dem Öffnen kommt es zur schnellen Inaktivierung des Natriumkanals, wobei sich das Verbindungspeptid zwischen Domäne III und IV mit dem IFM-Partikel

(Sequenz der Aminosäuren Isoleucin [I], Phenylalanin [F] und Methionin [M]; Abb. 1.1) in die Porenöffnung bewegt und diese verlegt (hinged-lid Mechanismus; Ulbricht, 2005).

Genmutationen in  $\alpha$ -Untereinheiten von Natriumkanälen werden mit bestimmten Epilepsieformen, dem Long QT-Syndrom am Herzen oder auch hereditären Schmerzsyndromen in Verbindung gebracht (Isom, 2001; Meisler et al., 2001; Lampert et al., 2010). Auch eine Mutation der  $\beta 1$ -Untereinheit ist bekannt, die bei den Genträgern eine Epilepsie verursacht (Isom, 2001).

**$\beta$ -Untereinheiten.** Jede der vier bislang identifizierten, akzessorischen  $\text{Na}_v$   $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta 1$ - $\beta 4$ ) besteht aus einem einfachen Transmembransegment mit einem extrazellulären Amino- und einem intrazellulären Carboxy-Terminus. Die  $\beta$ -Untereinheiten können weder durch homologe noch durch heterologe Zusammenlagerung mehrerer Untereinheiten eine porenformende Struktur ausbilden und sind nicht direkt an der Spannungssteuerung beteiligt. In zentralen neuronalen Geweben sind die  $\alpha$ -Untereinheiten spannungsgesteuerter Natriumkanäle ( $\text{Na}_v$  1.1-1.3 und  $\text{Na}_v$  1.6; Lai und Jan, 2006) mit zwei akzessorischen  $\beta$ -Untereinheiten assoziiert (Catterall, 2000; Isom, 2001; Catterall et al., 2008). Die  $\alpha$ -Untereinheiten sind mit den  $\beta 2$ - und  $\beta 4$ -Untereinheiten über Disulfidbrücken und mit den  $\beta 1$ - und  $\beta 3$ -Untereinheiten nicht-kovalent verbunden (Isom et al., 1992; Morgan et al., 2000; Maier et al., 2004).  $\beta$ -Untereinheiten modifizieren die Kinetiken der Natriumkanäle (Catterall und Epstein, 1992; Catterall, 2000; Isom et al., 1992, 1995; Morgan et al., 2000; Maier et al., 2003). Sie regulieren die Kanal-Lokalisation in einer Zelle, interagieren mit zellulären Adhäsionsmolekülen und dem Zytoskelett (Isom et al., 1995; Isom, 2001). Aufgrund von Sequenzhomologien werden die  $\beta$ -Untereinheiten in die Immunoglobulin-Superfamilie der Zell-Adhäsions-Moleküle eingeordnet (Isom und Catterall, 1996; Isom, 2001; Kaczmarek, 2006). Diese Familie ist im Nervensystem vermutlich für die Regulation der neuronalen Migration und der axonalen Wegleitung und Zielsuche (axonal guidance) verantwortlich (Maness und Schachner, 2007; s. Abschnitt 1.3.2).

### 1.2.2 Spannungsabhängige Kaliumkanäle der KCNQ-Familie

Die KCNQ-Familie umfasst bisher fünf spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (KCNQ1-5 [Kv7.1-7.5]; KCNQ:  $K^+$ -Channel, Long QT-Syndrom assoziiert; Gutman et al., 2003). Für vier Mitglieder dieser Familie sind Krankheits-erzeugende genetische Mutationen bekannt (Tab. 1.1; Jentsch, 2000; Schwake et al., 2006).

Tab. 1.1: **Charakteristika spannungsgesteuerter KCNQ-Kanäle.** LQTS: Long QT-Syndrom; BFNC: Benign Familial Neonatal Convulsions; DFNA2: Deafness non-syndromic 2 (progressiver Hörverlust). Der autosomal dominante Vererbungsmodus des Long QT-Syndroms (LQTS1) wird auch als Romano–Ward Syndrom, die rezessive Form in Kombination mit einer kongenitalen Taubheit als Jervell-Lange-Nielsen Syndrom bezeichnet (Quellen: Jentsch, 2000; Robbins, 2001; Cooper und Jan, 2003; Gutmann et al., 2005; Brown und Passmore, 2009).

	<i>KCNQ1</i>	<i>KCNQ2</i>	<i>KCNQ3</i>	<i>KCNQ4</i>	<i>KCNQ5</i>
<i>Chromosom</i>	11p15.5	20q13.3	8q24	1p34	6q14
<i>Aminosäuren</i>	676	872	872	695	932
<i>Vorwiegende Expressionsmuster (mRNA)</i>	Herz, Cochlea	ZNS, Ganglien	ZNS, Ganglien	Cochlea, vestibuläre Haarzellen	ZNS, Ganglien, Skelettmuskel
<i>Assoziationspartner</i>	KCNE1, KCNE3	KCNQ3, KCNE2	KCNQ2, KCNQ4, KCNQ5, KCNE2	KCNQ3	KCNQ3
<i>funktionaler Strom</i>	Kardialer $I_{Ks}$ -Strom	M-Strom ( $I_{K(m)}$ )	M-Strom ( $I_{K(m)}$ )	$K^+$ -Strom (äußere Haarzellen)	M-Strom ( $I_{K(m)}$ )?
<i>Phänotyp bei Mutation</i>	LongQT-Syndrom (LQTS1)	Epilepsie (BFNC)	Epilepsie (BFNC)	Taubheit (DFNA2)	nicht bekannt

#### 1.2.2.1 KCNQ2- und KCNQ3-Kanäle erzeugen den neuronalen M-Strom

Verschiedene Mutationen der humanen KCNQ2- und KCNQ3-Gene bewirken bei betroffenen Neugeborenen innerhalb der ersten sieben Lebensstage fokale oder generalisierte epileptische Anfälle (BFNC: Benign Familial Neonatal Convulsions; Singh et al., 1998; Charlier et al., 1998; Hirose et al., 2000; Jentsch, 2000; Fröscher et al., 2004; Hahn und Neubauer, 2009). Bis zum dritten Lebensmonat einsetzende Kompensationsmechanismen führen in etwa 84% der betroffenen Neonaten zu

einem vollständigen Verschwinden der klinischen Symptomatik. Die restlichen 16% entwickeln im Laufe ihres Lebens eine Epilepsie (Ronen et al., 1993).

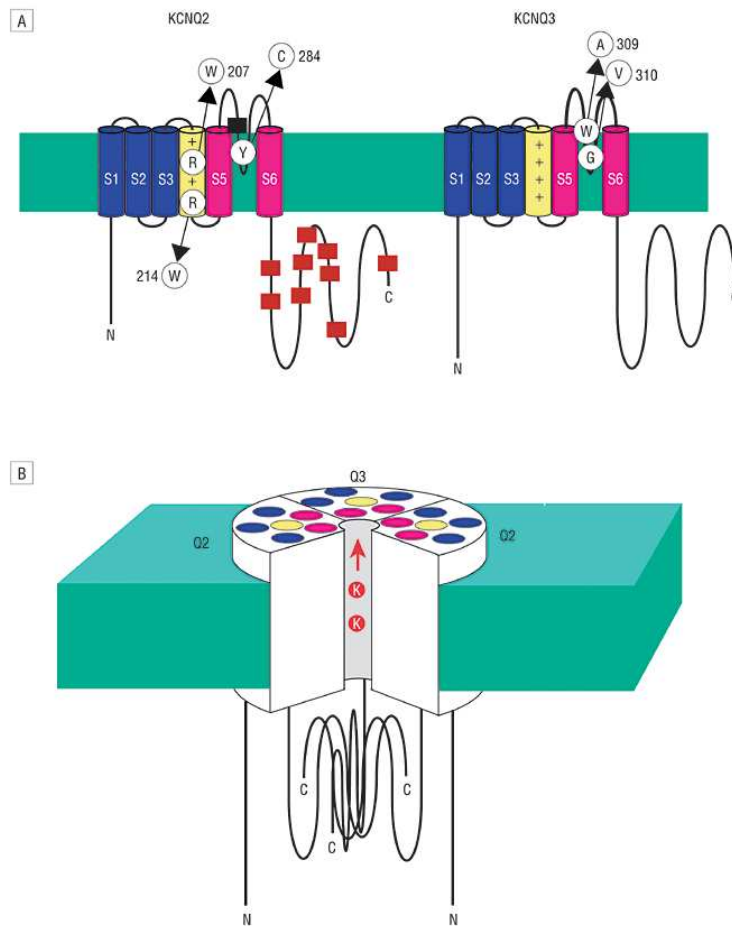


Abb. 1.2: **Grundstruktur der KCNQ2- und KCNQ3-Kanäle.** A) Molekulare Struktur einer der vier zur Ausbildung eines funktionalen Kanals nötigen KCNQ2 und/oder KCNQ3  $\alpha$ -Untereinheiten, die aus 6 TM-Segmenten besteht. S5 und S6 (rote Zylinder in A und B) bilden mit der Porenschleife die Kanalpore. Die Segmente S1 bis S4 mit den positiv geladenen Aminosäuren in S4 (gelb) bilden den Spannungssensor. Die BFNC-Mutationen sind durch Symbole an den entsprechenden Aminosäurepositionen (Nummern) angezeigt (AS-Substitution: Kreise; AS-Abbruch: rote Quadrate). B) zeigt den tetrameren Kanal in seiner heteromeren Konfiguration aus KCNQ3 und KCNQ2  $\alpha$ -Untereinheiten. Die vierte Domäne/Untereinheit ist zur besseren Einsicht in die zentrale Porenstruktur nicht eingezeichnet (aus Cooper und Jan, 2003).

**$\alpha$ -Untereinheiten.**  $K_v7$ -Kaliumkanäle ähneln den spannungsabhängigen Natriumkanälen sowohl in ihrer porenformenden Grundstruktur (S5, S6 und Porenschleife), als auch in ihren, die Spannungsabhängigkeit der Kanäle definierenden Sequenzen S1 bis S4 (Abschnitt 1.2.1).

$K_v7$ -Kanäle setzen sich aus vier getrennten Untereinheiten zusammen, welche separat codiert und daher posttranslational nicht als vollständige Proteine vorliegen. Sie assoziieren erst in der Membran zu einem funktionalen, tetrameren Kanal (MacKinnon, 1991a, b, c; Papazian, 1999).

Ströme durch heteromultimere Kanäle, kurz Heteromere, aus KCNQ2 und KCNQ3 sind mehr als zehnfach größer als die durch homomere Kanäle (Wang et al., 1998;

Main et al., 2000), was auf eine gesteigerte Oberflächenexpression funktionaler Kanäle zurückzuführen ist (Schwake et al., 2000).

Innerhalb einer  $K_v7$ -Subfamilie können sich Heteromere aus verschiedenen Untereinheiten bilden. Jede der fünf  $K_v7$   $\alpha$ -Untereinheiten ist in der Lage, homomere Kanäle auszubilden. KCNQ1 kann keine funktionalen, heteromeren Kanäle mit anderen Mitgliedern aus der KCNQ-Familie formen, jedoch bilden KCNQ2, 4 und 5 mit KCNQ3  $\alpha$ -Untereinheiten funktionierende Kanäle (Tabelle 1.1; Schroeder et al., 2000; Lerche et al., 2000; Robbins, 2001).

**$\beta$ -Untereinheiten.** Die KCNQ  $\alpha$ -Untereinheiten werden durch fünf bekannte, akzessorische  $\beta$ -Untereinheiten (KCNE1-5) funktional moduliert (Sanguinetti et al., 1996; Barhanin et al., 1996; McCrossan und Abbott, 2004). Die  $\beta$ -Untereinheiten bestehen aus einem einzelnen Transmembransegment (1TM) mit einer intra- und einer extrazellulären Domäne (Takumi et al., 1988; Abbott und Goldstein, 2001).

**M-Ströme.** Es ist weitgehend anerkannt, dass KCNQ2/3-Heteromere die Hauptvertreter der 1980 durch Brown und Adams beschriebenen, neuronalen M-Ströme  $I_{K(M)}$  sind (Wang et al., 1998; Shapiro et al., 2000). Der klassische  $I_{K(M)}$ -Strom ist ein langsam aktivierender und langsam deaktivierender  $K^+$ -Strom ohne Inaktivierung (Brown und Yu, 2000). Der M-Strom wird durch die Zusammensetzung der ihm zugrunde liegenden KCNQ  $\alpha$ -Untereinheiten (Tab.1.1; Schroeder et al., 2000; Lerche et al., 2000) und der KCNE2  $\beta$ -Untereinheiten moduliert (Tinel et al., 2000). Weiter wird er über  $G_q$ -Protein vermittelte 2<sup>nd</sup>-Messenger Prozesse moduliert (Suh und Hille, 2002, 2007; Suh et al., 2004) und durch Muskarin inhibiert. Er reguliert die Exzitabilität von Neuronen bei repetitiver Entladung und deren Antwortverhalten auf synaptische Reize (s. auch Abschnitt 4.2).

### **1.2.2.2 KCNQ1- und KCNE1-Kanäle erzeugen den kardialen $I_{Ks}$ -Strom**

Dem im Herzen an der Repolarisation beteiligten  $I_{Ks}$ -Strom liegen Heteromere aus KCNQ1  $\alpha$ - und KCNE1  $\beta$ -Untereinheiten zugrunde (Tab.1.1; Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996). Mutationen im KCNQ1- und KCNE1-Genom resultieren in dem Long QT-Syndrom (LQTS; Mutation von KCNQ1  $\triangleq$  LQTS1; Mutation von KCNE1  $\triangleq$  LQTS5). Diese Mutationen führen zu einer Verlängerung der kardialen Repolarisationsphase, was sich im EKG in einem verlängerten QT-Intervall zeigt. Träger dieser Mutationen leiden unter potentiell letalen Arrhythmien. Die Assoziation der KCNE1  $\beta$ -Untereinheiten mit KCNQ1 erhöht die KCNQ1-Stromamplitude, verschiebt deren Aktivierung in depolarisierte Potentialbereiche, verlangsamt die Aktivierung und maskiert die Inaktivierung, die von KCNQ1-Homomeren induziert wird (Robbins, 2001; Abschnitt 3.4 & 4.2).

### **1.2.3 Ionenkanäle und die Alzheimer'sche Demenz**

Viele der Regulationsmechanismen, denen Ionenkanäle unterliegen sind bis heute noch unbekannt. In der letzten Zeit mehren sich die Hinweise, Vertreter der spannungsgesteuerten Ionenkanäle würden durch ein für die Pathogenese des Morbus Alzheimer wichtiges Enzym, der  $\beta$ -Sekretase (BACE1;  $\beta$ -site-APP-cleaving enzyme 1), mit reguliert. So spaltet BACE1 die  $\beta$ -Untereinheiten spannungsabhängiger Natriumkanäle und darüber hinaus interagiert diese Sekretase direkt mit den  $\alpha$ -Untereinheiten von Natriumkanälen (Kim et al., 2007; Huth et al., 2009). Dies führt in den untersuchten Zellsystemen zu Änderungen ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften. Auch die KCNE  $\beta$ -Untereinheiten spannungsgesteuerter Kaliumkanäle stellen indessen nachgewiesene Substrate der BACE1 dar (D. Y. Kim, personal communication und Posterbeitrag auf dem 39. Treffen der Society for Neuroscience, 2009, Chicago, IL ). Eine eingehendere Untersuchung dieser Interaktionen mit der amyloidogenen  $\beta$ -Sekretase erfolgt im Rahmen dieser Arbeit.

### 1.3 Morbus Alzheimer

Die Alzheimer'sche Demenz (AD) ist die Demenzform mit der weltweit höchsten Prävalenz. Schätzungen gehen von derzeit ca. 24 Millionen Betroffenen weltweit aus. Eine Zahl, die sich angesichts des demografischen Wandels voraussichtlich alle 20 Jahre verdoppeln soll (Ferri et al., 2005).

Mit etwa 95% der Fälle macht die sporadische Form der Alzheimer'schen Demenz (SAD) den weitaus größten Anteil der an AD erkrankten Individuen aus. Die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung von SAD sind das Alter, das Vorhandensein des Apolipoprotein E4-Allels (Corder et al., 1993), Schädel-Hirn-Traumata, zerebrale Schlaganfälle und Erkrankungen des kardiovaskulären Systems (Kivipelto et al., 2002a, b; Sun et al., 2006; Naderi et al., 2006; Cole und Vassar, 2009).

Die familiär bedingte Form der Alzheimer'schen Demenz (FAD; ca. 5% der AD-Patienten) hat viel zur Aufklärung der Pathogenese der AD beigetragen. Sie ist durch autosomal dominant vererbte Mutationen der Preseniline (PS1 [Chromosom 14] & PS2 [Chromosom 1]; Schellenberg et al., 1992; Levy-Lahad et al., 1995) oder des amyloiden Vorläuferproteins (APP) bedingt (APP, Amyloid Precursor Protein [Chromosom 21]; Goate et al., 1991). Betroffene Patienten leiden an einer beinahe 100%-igen Penetranz.

#### 1.3.1 Pathologie der AD

Die AD ist eine progressive, neurodegenerative Erkrankung. Extrazelluläre Ablagerungen von  $\beta$ -Amyloid ( $A\beta$ , 4 kDa, 40-42AS) in den sogenannten Senilen Plaques und die intrazelluläre Ansammlung von neurofibrillären, hyperphosphorylierten Bündeln des Mikrotubuli-assoziierten Tau-Proteins (Tau Tangles) definieren die AD histopathologisch (Cole und Vassar, 2007a, b). Vor allem die Aggregation der  $A\beta$ -Proteine verursacht vermutlich die bei AD-Patienten beobachtete Neurodegeneration (Golde et al., 2006). Da hauptsächlich neokortikale und limbische Hirnregionen, sogenannte Higher-Order-Brain Regions, betroffen sind

(Braak und Braak, 1996), ist der mit der AD assoziierte neuropsychiatrische Phänotyp so komplex.

### 1.3.1.1 BACE1 als initialer Pathogenitätsfaktor der AD

Ausgangspunkt für das pathogenetisch wirksame A $\beta$ -Protein ist das APP (Esler und Wolfe, 2001). APP ist ein ubiquitär exprimiertes Transmembranprotein (Typ I) mit einem größeren, extrazellulär lokalisierten, N-terminalen Ende und einem kleineren, zytosolischen C-Terminus (Abb. 1.3). Eine einleitende, enzymatische Spaltung des APP durch die  $\beta$ -Sekretasen (BACE1; Abschnitt 1.3.1.2) und anschließend durch  $\gamma$ -Sekretasen führt zur Entstehung der pathogenen A $\beta$ -Peptide (Vassar et al., 1999; Vassar, 2004).

Neben diesem sogenannten amyloidogenen Pathway kann das APP alternativ über eine non-amyloidogene Ereignissequenz prozessiert werden: Die initiale Spaltung des APP durch eine  $\alpha$ -Sekretase führt nicht zur Entstehung von A $\beta$  (Abb. 1.2; Vassar, 2004).

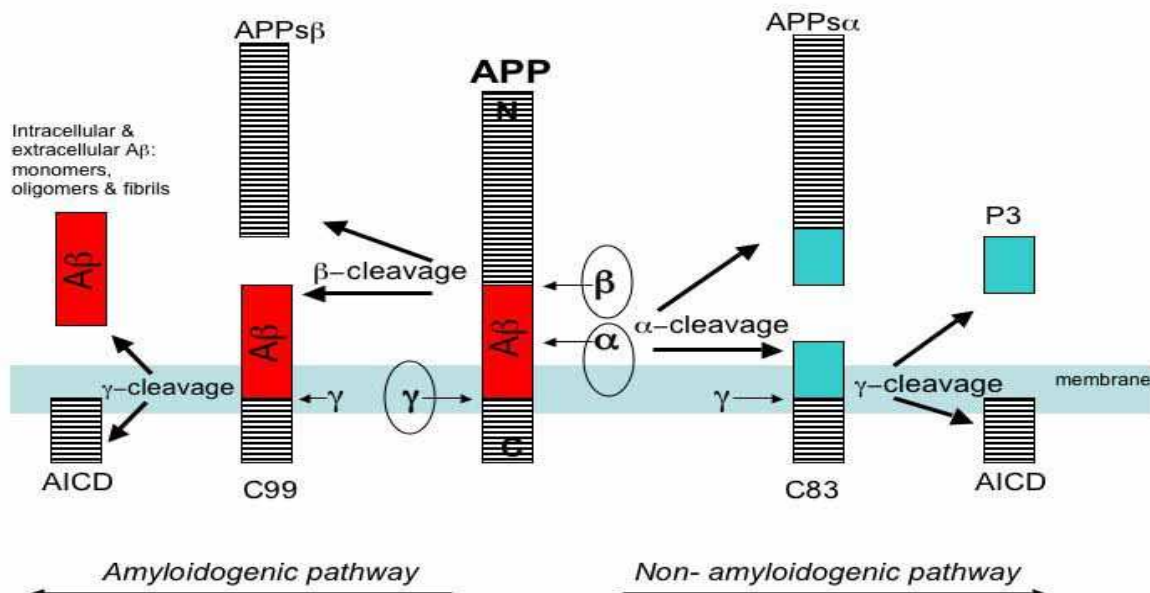


Abb. 1.3: **APP-Metabolismus.** Die sequentielle Spaltung durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen ( $\beta$ -/ $\gamma$ -cleavage) führt über den amyloidogenen Weg (Pathway) zur Bildung von pathogenem A $\beta$  (rot). Ein alternativer, non-amyloidogener Weg, wird von einer Prozessierung des APP durch die  $\alpha$ -Sekretasen eingeleitet, gefolgt von einer Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretasen (aus Cole und Vassar, 2007a).



Bei der amyloidogenen Spaltung des APP durch BACE1 entsteht ein lösliches, N-terminales APPs  $\beta$ -Fragment (secreted) und ein aus 99 Aminosäuren bestehendes, membrangebundenes, C-terminales Fragment (C99) (Abb. 1.3). Das C99-Fragment wird in der Zellmembran vom  $\gamma$ -Sekretasekomplex weiterprozessiert, und es entsteht ein zytosolisches AICD-Fragment (APP intracellular domain). Eine Funktion der AICD-Domäne als Transkriptionsfaktor steht derzeit zur Diskussion (Cao und Sudhof, 2004). Extrazellulär wird amyloidogenes A $\beta$  freigesetzt.

A $\beta$ -Peptide weisen, da sie durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex inkonstant prozessiert werden, C-Termini von unterschiedlicher Länge auf (zwischen 38 und 43 AS). Die  $\gamma$ -Sekretase präferiert die Schnittstelle an AS40 des APP und produziert dadurch A $\beta$ 40. Wird APP an AS-Position 42 geschnitten, entstehen besonders pathogene (fibrillogene) und schwer lösliche A $\beta$ 42-Peptide, die mit einem Auftreten der familiären Form von AD (FAD; early onset) assoziiert sind (Younkin, 1998; Hardy, 2007).

APP kann initial auch durch eine  $\alpha$ -Sekretase geschnitten werden, beispielsweise besitzen ADAM-9 (a disintegrin and metalloprotease domain-9), ADAM-10 (Lammich et al, 1999) und TACE (tumor necrosis faktor-a converting enzyme; Buxbaum et al., 1998) eine  $\alpha$ -Sekretaseaktivität. Im non-amyloidogenen Weg entsteht nach  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Prozessierung kein amyloidogenes A $\beta$ , sondern zuerst eine lösliche, N-terminale APPs  $\alpha$ -Ektodomäne und ein C-terminales, membrangebundenes Fragment (C83; vermittelt durch die  $\alpha$ -Sekretase). Durch die  $\gamma$ -Sekretase vermittelt, wird aus C83 ein zytosolisches AICD-Fragment und extrazellulär ein nicht pathogenes Peptid (P3; 3kDa) abgespalten.

Ob die  $\gamma$ -Sekretase amyloidogenes A $\beta$  produziert, hängt demnach davon ab, ob APP vermehrt durch die  $\alpha$ -Sekretase (Endergebnis: AICD & P3, non-amyloidogener Weg) oder durch BACE1 geschnitten wurde (Endergebnis: AICD & A $\beta$ , amyloidogener Weg; Skovronsky et al., 2000).

### 1.3.1.2 Das $\beta$ -site-APP-cleaving enzyme 1 (BACE1)

BACE1 ist die derzeit einzig bekannte  $\beta$ -Sekretase, die über die amyloidogene Ereignissequenz (Abschnitt 1.3.1.1) zur Produktion der pathogenen A $\beta$ -Peptide führt (Hussain et al., 1999; Yan et al., 1999; Vassar et al., 1999; Sinha et al., 1999; Lin et al., 2000).

BACE1, auch Memapsin 2 (Mem2) oder Aspartylprotease 2 (Asp2) genannt, ist eine membranständige Aspartylprotease und besteht aus 501 AS (Abb. 1.4). In geringem Ausmaß wird sie in nahezu allen Geweben exprimiert. Die höchste Dichte der aktiven BACE1 findet sich in Neuronen des Gehirns (Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Ihre optimale katalytische Aktivität erreicht BACE1 im sauren Milieu (pH ~ 5.5; Koo und Squazzo, 1994; Nawrot, 2004). BACE1 schneidet das APP an Asp+1 und Glu+11 (Vassar et al., 1999; Cole und Vassar, 2007a, b) und kann als Monomer oder als Dimer vorliegen. In der Dimer-Konfiguration weist die  $\beta$ -Sekretase ihre höchste katalytische Aktivität auf (Cole und Vassar, 2008).

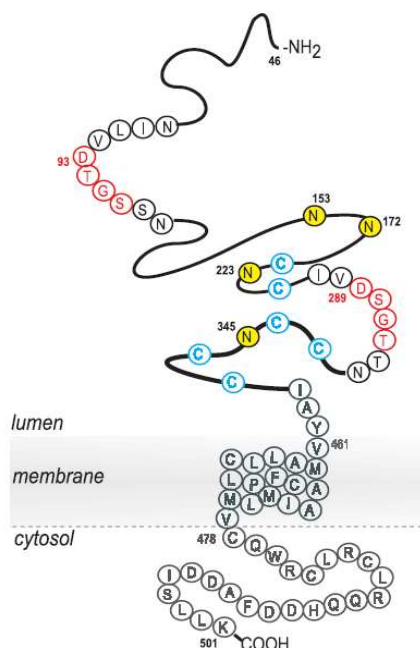


Abb. 1.4: **Schematische Darstellung der BACE1.** Die katalytische Aktivität wird durch zwei enzymatisch aktive, N-terminale Domänen vermittelt (AS93-96 & AS289-292; rote AS-Sequenzen). Mutiert eines dieser zwei katalytischen Motive, wird die Sekretase inaktiviert (aus Nawrot, 2004).

### 1.3.2 Physiologische Substrate und Funktion der BACE1

Neben dem APP sind mittlerweile weitere Substrate der BACE1 identifiziert worden, bei denen es sich jeweils um membrangebundene Proteine handelt (Vassar et al., 2009).

Die zum APP homologen APLP1 und APLP2 (APP-like protein; Li und Sudhof, 2004) weisen keine A $\beta$ -Sequenzen auf und sind folglich nicht an der Generierung des A $\beta$ -Pools verantwortlich. Die nach der  $\beta$ -/ $\gamma$ -Prozessierung entstehenden, intrazellulären Fragmente üben laut Scheinfeld et al. (2002) regulatorische Einflüsse auf die Transkription aus.

Eine mögliche Funktion der BACE1 als Stress-Responsive-Protein wird diskutiert (Vassar et al., 2009). In diesem Zusammenhang sind sowohl der Interleukin-1 Rezeptor II (IL-1R2; Garlind et al., 1999; Kuhn et al., 2007), als auch die Beta-Galactosid alpha 2.6-Sialyltransferase (ST6Gal1; Kitazume et al., 2001) und das Leukozyten-Adhäsionsprotein P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1; Lichtenthaler et al., 2003) als BACE1-Substrate zu nennen.

Die Spaltung dieser Proteine durch BACE1 führt zu einer Limitierung der für die AD pathognomonischen, neuroinflammatorischen Prozesse (Akiyama et al., 2000; Rosenberg, 2005). Dennoch induzieren die unter AD chronisch erhöhten BACE1-Spiegel über die A $\beta$ -Plaquebildung eine indirekte Entzündungsreaktion (Cole und Vassar, 2007a).

BACE1 schneidet LRP (Low Density Lipoprotein-Receptor-Related Protein; Van et al., 2002; Lleo et al., 2005; von Arnim et al., 2005), einen transmembranären Rezeptor für APO E und APP, die beide mit der AD assoziiert sind. Eine möglicherweise von LRP ausgehende Neuroprotektivität wird diskutiert, seitdem bekannt ist, dass LRP den A $\beta$ -Abbau fördert (Kang et al., 2000).

Zwei interessante BACE1-Substrate sind die Proteine Neuregulin-1 (NRG-1; Hu et al., 2006; Willem et al., 2006) und Neuregulin-3 (NRG-3; Hu et al., 2008), die für Myelinisierungsprozesse wichtig sind. NRG-1 initiiert in diesem Zusammenhang die Myelinisierung im peripheren Nervensystem (PNS) und ist gleichzeitig im gesamten

Nervensystem als Regulator der Markscheidendicke verantwortlich. NRG-1 ist ein Ligand für ErbB-Rezeptoren, die der Familie der Rezeptor-Tyrosin Kinasen angehören. Diese Kinasen haben im ZNS eine Vielzahl von Funktionen. So regulieren sie neben der schon erwähnten Myelinisierung auch die neuronale Migration und Synapsenbildung, beeinflussen die neuronale Plastizität und modulieren die Expression von Neurotransmittern (Savonenko et al., 2008).

Bezüglich NRG-1 besteht eine enge genetische Korrelation mit dem Auftreten der Schizophrenie (Stefansson et al., 2004). Heterozygote NRG-1 Knockout-Mäuse weisen einen Phänotyp auf, der viele Kriterien einer Schizophrenie im Mausmodell erfüllt. Merkmal einer Schizophrenie ist die vorherrschende Dysregulation der glutamatergen und GABA-ergen Transmittersysteme. In diesem Kontext scheint eine direkte Verbindung zu dem NRG-1/ErbB-vermittelten Signalwegen zu bestehen, da diese sowohl die strukturelle und funktionelle Plastizität des glutamatergen Systems beeinflussen, als auch die GABA-erge Transmission regulieren können. Ein möglicher Einfluss von BACE1 auf diesen NRG-1/ErbB Signalweg konnte u.a. anhand eines Schizophrenie-ähnlichen Phänotyps homozygoter BACE1 Knockout-Mäuse nachgewiesen werden (Savonenko et al., 2008). In diesem Zusammenhang ließ sich unter erhöhten A $\beta$ -Peptidspiegeln neben einer endozytotischen Reduktion oberflächiger, synaptischer Glutamatrezeptoren auch eine Synapsendegeneration beobachten (Hsieh et al., 2006). Diese Erkenntnisse könnten einen Erklärungsansatz für den unter der AD auftretenden, neuropsychiatrischen Phänotyp bieten.

In neuronalen Dendriten moduliert BACE1 eine durch die  $\beta$ 4-Untereinheiten von Na $_v$ -Kanälen vermittelte Ausbildung Filopodien-artiger Ausstülpungen (Miyazaki et al., 2007). Diese Filopodienausbildung wird in einem engen Zusammenhang mit der Synaptogenese gesehen (Yuste und Bonhoeffer, 2004). So beeinflusst BACE1 offenbar auch wichtige Hirnreifungsprozesse. Eine Funktion, die in der frühen postnatalen Zeit von besonderem Interesse sein könnte, da in dieser Entwicklungsphase auch die höchsten BACE1-Dichten gemessen werden (Willem et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit sind u.a. die  $\beta$ 2-Untereinheiten neuronaler Na $_v$ -Kanäle als BACE1-Substrate untersucht worden. Im zentralen Nervensystem unterliegen die  $\beta$ 2-

Untereinheiten analog zum APP-Metabolismus einer sequentiellen Prozessierung durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen (Kim et al., 2005, 2007; Wong et al., 2005). In Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) und hippocampalen Neuronen BACE1-transgener Mäuse konnten Kim et al. (2007) nachweisen, dass die BACE1 über eine Spaltung der  $\text{Na}_v \beta 2$ -Untereinheiten sowohl die zytosolischen Expressionsdichten von  $\text{Na}_v 1.1 \alpha$ -Untereinheiten, als auch deren Verteilung an der Zelloberfläche regulieren kann. Diese beobachtete, transkriptionelle Eigenschaft wird den durch BACE1-Prozessierung entstehenden  $\beta 2$ -ICD Fragmenten ( $\beta 2$ -intracellular domain) zugeschrieben. Huth et al. (2009) zeigten, dass BACE1 in Abwesenheit der  $\text{Na}_v \beta 2$ -Untereinheiten die  $\text{Na}_v 1.2 \alpha$ -Untereinheiten auch direkt modulieren kann (s. Abschnitt 3.1 und 4.1).

## 1.4 Fragestellung

BACE1 wird derzeit als vielversprechendes pharmakologisches Target gegen AD diskutiert. Es ist daher wichtig, die physiologischen Funktionen dieser Sekretase genau zu identifizieren, um mögliche Konsequenzen einer pharmakologischen BACE1-Suppression besser abschätzen zu können. Ein zunächst als unauffällig beschriebener Phänotyp von BACE1-Knockout Mäusen (z.B. Roberds et al., 2001) ließ sich durch mehrere Arbeiten widerlegen (Harrison et al., 2003; Dominguez et al., 2005; Rockenstein et al.; 2005) und verdeutlicht die physiologische Relevanz der  $\beta$ -Sekretase.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, den in der Literatur beschriebenen Einfluss der BACE1 auf Natriumkanäle (Wong et al., 2005; Kim et al., 2007; Huth et al., 2009) unter Verwendung des Neuroblastomzellsystems elektrophysiologisch eingehender zu charakterisieren.

Als weitere, potentielle BACE1-Targets bieten sich spannungsgesteuerte, neuronale und kardiale KCNQ-Kaliumkanäle an. Durch Überexpression unterschiedlicher Kombinationen von  $\beta$ 2- bzw.  $\beta$ 4-Natriumkanaluntereinheiten, BACE1, KCNQ2/3 und KCNQ1/E1 in HEK293- und Neuroblastomzellen soll deren gegenseitige Einflussnahme elektrophysiologisch quantifiziert werden.

Sekundär soll der Frage nachgegangen werden, ob die innerhalb sogenannter Signalkomplexe (Meadows und Isom, 2005; Deschênes et al., 2008) kolokalisierten KCNQ2- beziehungsweise KCNQ3-Kanäle funktionale Interaktionspartner von  $\beta$ 2- und  $\beta$ 4-Natriumkanaluntereinheiten sind und inwieweit sich eine mögliche BACE1-vermittelte Spaltung der  $\beta$ -Untereinheiten auf diese Interaktion auswirkt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Eukaryotische Zellkulturen**

#### **2.1.1 HEK293-Zellen**

Die durch Transformation des humanen Adenovirus Typ 5 etablierte, permanente Zelllinie HEK293 (ATCC-Nummer [www.atcc.org]: CRL-1573) stammt von einer menschlichen, embryonalen Nierenzelle ab (Graham et al., 1977). HEK293-Zellen zeigen ein epithelial adhärentes Wachstumsmuster. Folgende Eigenschaften erweisen sich als vorteilhaft für Experimente im transienten Expressionssystem: Ihre hohe Teilungsrate, ihre Unempfindlichkeit gegenüber der Zusammensetzung des Nährmediums, gegenüber Änderungen der Temperatur oder des pH-Wertes der Badlösung und ihre gute Toleranz gegenüber der enzymatischen Behandlung mit Trypsin zur Zellseparation. Des Weiteren macht die nur geringe Hintergrundaktivität von intrinsischen Kanälen die HEK293-Zellen zu einem guten Expressionssystem, um Ionenkanäle zu untersuchen. Die endogene Expression einer heterogenen Gruppe von Kaliumkanälen in diesen Zellen verursacht messbare Kaliumauswärtsströme, deren Anteil am Gesamtstrom durch die Überexpressionsexperimente meist aber vernachlässigbar gering ausfällt (Yu und Kerchner, 1998; Jiang et al., 2002; Avila et al., 2004; Varghese et al., 2006; Kurejová et al., 2007). Überdies konnte die intrinsische Expression einer Spleißvariante der  $\beta 1$ -Untereinheiten spannungsabhängiger Natriumkanäle ( $\text{Na}_v \beta 1A$ ) nachgewiesen werden (Moran et al., 2000).

#### **2.1.2 N1E-115-Zellen**

Die murine Neuroblastomzelllinie N1E-115 (ATCC Nummer: CRL-2263) wurde mittels Klonierung der Linie C-1300 gewonnen (Amano et al., 1972; Tuttle und Richelson, 1975; Shastry et al., 2001). Neuroblastomzellen eignen sich aufgrund ihres neuronalen Ursprungs (Alberts, 2000), ihrer hohen Teilungsfähigkeit und ihren den anderen neuronal erregbaren Geweben vergleichbaren Strömen (Kostyuk et al., 1978; Moolenaar und Spector, 1978; Fishman und Spector, 1981; Nagy et al., 1983)

besonders gut, um sie als Expressionssystem neuronaler Proteine zu nutzen, wie es in dieser Arbeit erfolgt ist.

### **2.1.3 Kultur**

Um das Risiko einer Kontamination zu minimieren, fand die Handhabung der Kulturen unter Einhaltung der Grundlagen für steriles Arbeiten statt (z.B. Coté, 2001). Sämtliche Arbeitsschritte mit den Kulturen erfolgten an einer Sterilbank (CleanBench HERAsafe KS, Kendro/Thermo Electron, Waltham, USA). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Innova™ 4230, New Brunswick, Nürtingen, Deutschland) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 100% wasserdampfgesättigter Atmosphäre in 50 ml-Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht), deren Schraubverschluss mit einem gaspermeablen Filter versehen war. In den Flaschen befanden sich 10 ml Zellmedium (Abschnitt 2.1.7). Die aus dem Zellmetabolismus anfallenden sauren Valenzen wurden weitestgehend im Rahmen der Bikarbonatpufferung (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> im Medium und konstanter CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank) neutralisiert. Das Medium wurde alle 2-3 d ersetzt. Sobald die Zellen konfluent gewachsen waren, mussten sie gesplittet werden. Das Ablösen und Umsetzen der Zellen (Passagieren) erfolgte durch zweimaliges Auswaschen des Mediums in der Kulturflasche mittels 2 ml PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, München) und anschließender 5 min Einwirkung von 1 ml Trypsin/EDTA (0.05% Trypsin, 0.02% EDTA; Sigma, München) bei 37°C im Brutschrank. Danach wurden die Zellen unter der Clean-Bench durch Klopfen und vorsichtiges Resuspendieren mittels Pipette vom Flaschenboden und aus ihrem Zellverbund gelöst und im Verhältnis von circa 1:20 gesplittet. Die anschließende Zugabe von Medium inaktivierte das Trypsin.

### **2.1.4 Einfrieren**

Das Anlegen von Backup-Kulturen ist für einen sicheren Fortbestand der Kulturen essentiell. Diese Sicherheitskulturen können reaktiviert werden, wenn die bisher aktiven Kulturen durch Kontamination mit anderen Organismen, oder in Folge der sich mit den Generationen verändernden Zellmorphologie/-eigenschaften nicht weiter verwendet werden können. Zum Einfrieren wurden  $1.5 - 2.5 \cdot 10^6$  Zellen in 0.75 ml



Medium in ein Kryotube überführt. Diesem wurde 0.75 ml Medium, mit 20% DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma, München) versetzt, beigefügt und aufgrund der Zytotoxizität von DMSO zügig in einen -80°C-Gefrierschrank überführt. Um ein zu schnelles Abkühlen zu verhindern, wurden die Tubes mit Zellstoff umwickelt.

### **2.1.5 Auftauen**

Noch während des Auftauens wurde der Kryotube bei 1500 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das entstehende Zellpellet wurde nach Verwerfen des Überstandes mit 10 ml Medium in eine Kulturschale überführt. Nach 3-14 d wurden die Zellen dann für Messungen verwendet bzw. das erste Mal gesplittet.

### **2.1.6 Aussaat**

24 h vor einer Transfektion (Abschnitt 2.2.3) beziehungsweise mindestens 1-2 h vor den Messungen wurden die passagierten Zellen mit 2 ml Medium in Petrischalen für adhärente Zellen mit 35 mm Durchmesser (BD Biosciences, Heidelberg) überführt.

### **2.1.7 Nährmedium**

Sowohl die HEK293-, als auch die N1E-Zellen wurden in D-MEM (Dulbecco's Modified-Eagle-Medium, Invitrogen, Carlsbad, USA) kultiviert (Glucosegehalt für HEK293: 1 g/l; für N1E-115: 4.5 g/l), dem 10% FCS (Fetal Calf Serum, Biochrom, Berlin) und eine 1%-ige Lösung an Penicillin/Streptomycin (Sigma, München) hinzugesetzt waren, um einer potentiellen Bakterienkontamination vorzubeugen.

### **2.1.8 Zellzählung**

Um eine adäquate Anzahl an Zellen für eine Transfektion auszusetzen, einzufrieren oder zu untersuchen, konnte man die Zellkonzentration bestimmen. Dazu wurden die mit Trypsin passagierten Zellen in 1.5 ml-Tubes überführt und bei 4°C und 2000 g

(Spectrafuge™ Mini, Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern) für 5 min sedimentiert. Das nach Verwerfen des Überstandes verbliebene Zellpellet wurde durch vorsichtiges Resuspendieren homogen in 1 ml Medium aufgenommen. 10 µl dieser Suspension wurden im Anschluss mit Trypanblaulösung ad 200 µl gemischt. Somit ergab sich ein Verdünnungsfaktor von 20. 10 µl dieser Trypanblauverdünnung wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Es wurden vier der insgesamt neun großen Kammern ausgezählt, deren Volumen (bei einer durch die Kapillarkräfte vorgegebenen Tiefe von 0.1 mm) jeweils  $10^{-4} \text{ cm}^3$  entspricht ( $1 \text{ cm}^3 \triangleq 1 \text{ ml}$ ). Durch folgende Gleichung ließ sich die Zellzahl je ml relativ präzise annähern:

$$\text{Zellen pro ml} = ([\text{Gesamtzellzahl} / 4] * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4).$$

## 2.2 Molekularbiologie

Die molekularbiologischen Arbeitsschritte fanden in Anlehnung an Sambrook et al. (2001) statt. Sofern vorhanden, wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

### 2.2.1 Vektoren und Bakterien

Zur Untersuchung des Einflusses der  $\beta$ -Sekretase (BACE1) und der Kalium- und Natriumkanaluntereinheiten auf spannungsgesteuerte  $K_v7$ - und  $Na_v$ -Ströme wurden die in Tab. 2.1 aufgelisteten Vektoren verwendet.

Tab. 2.1: **Vektoren und ihre Inserts.** \* Die jeweiligen Aminosäureschnittstellen sind für  $Na_v$  m $\beta$ 2-ctf: AS1-11 & 145-233; für  $Na_v$  m $\beta$ 2-ntf: AS1-144. \*\* KCNQ2 ist mit dem Flag-Epitop, KCNQ3 mit HA markiert. Mit aufgeführt sind die vektorspezifischen Antibiotika-Resistenzen und die Angabe der Quellen, von denen die Vektoren freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

Insert-cDNA	Vektor	Resistenz	Bezugsquelle
<i>hKCNQ1</i>	pFrog	Ampicillin	M. Schwake, Inst.f.Biochem., Kiel
<i>hKCNE1</i>	pFrog	Ampicillin	M. Schwake, Inst.f.Biochem., Kiel
<i>hKCNQ2</i> **	pcDNA3.1	Ampicillin	M. Schwake, Inst.f.Biochem., Kiel
<i>hKCNQ3</i> **	pcDNA3.1	Ampicillin	M. Schwake, Inst.f.Biochem., Kiel
<i>Na<sub>v</sub> m<math>\beta</math>4</i>	pcDNA3.1	Ampicillin	N.Nukina, RIKEN Br.Sc.Inst., Japan
<i>Na<sub>v</sub> h<math>\beta</math>2</i>	pCMV6-XL5	Ampicillin	OriGene/VWR International GmbH, Darmstadt
<i>Na<sub>v</sub> m<math>\beta</math>2-ctf*</i>	pcDNA3.1	Ampicillin	A.Rittger, Inst.f.Biochem., Kiel
<i>Na<sub>v</sub> m<math>\beta</math>2-ntf*</i>	pcDNA3.1	Ampicillin	A.Rittger, Inst.f.Biochem., Kiel
<i>mBACE1<sub>D289N</sub></i>	pcDNA3.1	Ampicillin	A.Rittger, Inst.f.Biochem., Kiel
<i>mBACE1</i>	pcDNA3.	Ampicillin	B.de Strooper,Cent.f.Hum.Gen.,Leuven
<i>hBACE1</i>	pcDNA3.	Ampicillin	C.Haass, Inst.f.Biochem., München
<i>c-EGFP</i>	pEGFP-C1	Kanamycin	Clontech, Mountain View, CA, USA

## **2.2.2 Bakterienklonierung und Isolierung von Plasmid-DNA**

Um genügend Vektor-DNA für die Expression in Zelllinien zu erhalten, mussten oben aufgeführte Vektoren (Tab. 2.1) amplifiziert werden. Dafür wurde wie folgt vorgegangen.

### **2.2.2.1 Transformation und Bakterienklonierung**

Die kompetenten *E. coli* (TOP10, Invitrogen, Carlsbad, USA) machen aufgrund ihrer sehr schnellen Vermehrung eine effektive Transformation mit der jeweiligen Vektor-DNA möglich. Dazu wurde ein Bakterien/DNA-Gemisch einem Temperaturschock ausgesetzt, die Bakterien im Kulturmedium angezüchtet und auf LB-Agar (Luria/Miller; Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe) ausplattiert. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurden aus den sichtbar gewachsenen Kolonien mittels steriler Pipettenspitze drei bis fünf Proben gepickt und jeweils in ein mit LB-Medium versetztes 5 ml-Fläschchen überführt. Die Medien als Selektionsmarker zugesetzten Antibiotika Ampicillin bzw. Kanamycin hatten eine Konzentration von 100 µg/ml bzw. 25 µg/ml.

Wuchsen die Bakterien progredient, so trat nach einer 24 h Inkubation bei 37°C im Schüttler (225 rpm) eine Trübung des Mediums auf. Die DNA aus 2-4 ml des Zell-Medium-Lysates wurde anschließend mit einer Miniprep<sup>®</sup> (Abschnitt 2.2.2.2; Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Mit einem Restriktionsverdau konnte die erfolgreiche Transformation des Vektors festgestellt werden. Die Selektion mit der höchsten Plasmid-Ausbeute wurde z.T. als Backup-Stock konserviert, respektive zur weiteren Verwendung amplifiziert.

### **2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA**

Mittels alkalischer Lyse ließ sich aus den *E. Coli* Bakterien Plasmid-DNA isolieren. Kleinere DNA-Mengen wurden durch eine Miniprep<sup>®</sup> gewonnen. Für größere Mengen wurde die Midi- oder die Maxiprep<sup>®</sup> (beide Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Sowohl Quantität als auch Qualität

der DNA-Isolierung konnten anschließend mit einer Absorptionsmessung im Spektrophotometer (Nanodrop<sup>®</sup>-1000; PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt werden. Dabei werden grundsätzlich die Absorptionsmaxima zweier Wellenlängen ( $\lambda = 260$  &  $280$  nm) miteinander verglichen. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei  $\lambda = 260$  nm (hauptsächlich durch deren aromatischen Ringe verursacht), das für Proteine bei  $\lambda = 280$  nm. Deren Relation ist ein Maß für die DNA-Reinheit bzw. für bestehende Proteinverunreinigungen (eine Ratio von  $260$  nm/ $280$  nm  $\geq 1.8$  ist ein Indikator für eine ausreichende DNA-Reinheit). Bis zur ihrer Verwendung wurde die DNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **2.2.3 Transiente Transfektionen**

Bei der transienten Transfektion mit Nanofectin<sup>®</sup> (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) wird die Vektor-DNA durch Komplexbildung mit kationischen Nanopartikeln der Transfektionssubstanz via Endozytose in die Zelle aufgenommen. Durch den zelleigenen Biosyntheseapparat wird die DNA anschließend zu funktionellen Proteinen translatiert (Nanofectin<sup>®</sup>-Manual). Die Transfektion mittels Nanofectin<sup>®</sup> erfolgte nach Herstellerprotokoll. Da in aller Regel keine dauerhafte Integration der Plasmid-DNA in das Wirtszellgenom stattfindet, ist die Expression der transfizierten Proteine zeitlich limitiert (transient). Um die erfolgreiche Transfektion des jeweiligen Proteins zu verifizieren, fanden diese immer als Kotransfektion mit einem zweiten Vektor statt, der für das Markerprotein EGFP kodiert. In der Annahme einer erfolgreichen Koexpression wurden die grün fluoreszierenden Zellen (Abb. 2.2 B) auf das interessierende Protein bzw. den interessierenden Kanal untersucht (siehe auch Abschnitt 2.3.2.3). Die für die transiente Transfektion benötigte cDNA-Menge betrug für die meisten Konstrukte  $1\text{ }\mu\text{g}$ , für BACE1 und EGFP  $0.5\text{ }\mu\text{g}$ . Bei Verwendung von KCNQ2 und KCNQ3 als Heteromere (Ratio 1:1) konnte die cDNA-Menge auf  $0.2\text{ }\mu\text{g}$  reduziert werden, um nicht zu große Stromamplituden zu erhalten. Die Messungen erfolgten 48-72 h nach Transfektion.

### **2.2.4 Compound 3**

Zeitgleich zur Transfektion der cDNA wurde dem Medium der HEK293-Zellen 10  $\mu\text{M}$  des spezifischen BACE1-Inhibitors Compound 3 (C3, Merck, Darmstadt, Deutschland; Piazzini et al., 2008; Silvestri, 2009) hinzugefügt. Die sich nun anschließenden Folgeapplikationen der jeweils gleichen Mengen an C3 fanden nach 90 min und anschließend alle 12 h bis zur Verwendung für die Patch-Clamp Messungen statt. Eine letzte Zugabe erfolgte beim Splitten der Zellen unmittelbar vor der Messung.

## **2.3 Elektrophysiologie**

### **2.3.1 Patch Clamp Technik**

Erwin Neher und Bert Sakmann haben 1976 mit der Entwicklung der Patch-Clamp Methode eine der wichtigsten elektrophysiologischen Arbeitsmethoden unserer Zeit etabliert (Hamill et al., 1981). Diese Leistung wurde 1991 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin honoriert. Dabei handelt es sich um eine Methode, mit deren Hilfe sich neben Ganzzellströmen erstmals Ströme einzelner Kanäle über Zellmembranen bestimmen lassen; eine essentielle Voraussetzung zur Erforschung des Stromtransportes durch Ionenkanäle und für die Analyse ihrer kinetischen Eigenschaften.

Die Patch-Clamp Technik stellt eine spezielle Variante der von Cole (1949) und Hodgkin, Huxley und Katz (1949) entwickelten Spannungsklemme dar. Dabei wird ein vorgegebenes Kommandopotential mit der tatsächlich an der Zellmembran anliegenden Spannung verglichen. Beim Auftreten einer Potentialdifferenz wird durch einen Verstärker ein kompensatorischer Strom erzeugt, dessen Eigenschaften eine indirekte Aussage über die Membranleitfähigkeit und der sie beeinflussenden Ionenkanäle zulässt.

Das Patch-Clamp Verfahren setzt die Herstellung einer mechanisch stabilen, elektrisch hochohmigen Verbindung zwischen der Pipettenspitze und der Zellmembran eines nur wenige  $\mu\text{m}^2$  großen Membranabschnittes (engl.: patch) voraus. Der tatsächliche Abstand zwischen Glaspipette und Membran misst infolge elektrostatischer Wechselwirkungen weniger als 1 nm. Man gewinnt solch einen

Gigaseal durch plötzliches Anlegen eines Unterdrucks, der elektrische Widerstand befindet sich im Gigaohm-Bereich ( $10^9 \Omega$ ). Dadurch lässt sich das Hintergrundrauschen minimieren, welches durch Leckströme am Übergang zwischen Membran und Pipettenspitze entsteht. Durch den Gigaseal ist es möglich, Ströme im Picoampere-Bereich ( $10^{-12} \text{ A}$ ), also in der Größenordnung von Strömen einzelner Kanäle zu detektieren, bei typischerweise angelegten Potentialen im Millivolt-Bereich ( $10^{-3} \text{ V}$ ).

Ohne das Seal zu zerstören, sind verschiedene Patchkonstellationen möglich, die erstmals von Hamill et al. (1981) vorgestellt wurden. Nach Erreichen des Gigaseals (Cell-Attached Konfiguration) kann man durch Anlegen eines plötzlichen Unterdrucks in den Whole-Cell Modus wechseln. Dadurch kommt es zum Durchbrechen der Zellmembran im Bereich der Pipettenmündung. Der direkte Zugang zum Zytosol erlaubt die Erfassung des über die gesamte Zellmembran fließenden Stromes. Die anderen Konfigurationen kommen in den Experimenten dieser Arbeit nicht zur Anwendung. Alle Strommessungen erfolgen im Voltage-Clamp Modus (Membranstrommessung bei vorgegebenen Potentialen).

### 2.3.2 Patch-Clamp Setup

Die in den folgenden Abschnitten 2.3.2 und 2.4 näher erläuterten Komponenten eines Patch-Clamp Aufbaus werden anhand des Schemas in Abbildung 2.3 veranschaulicht.

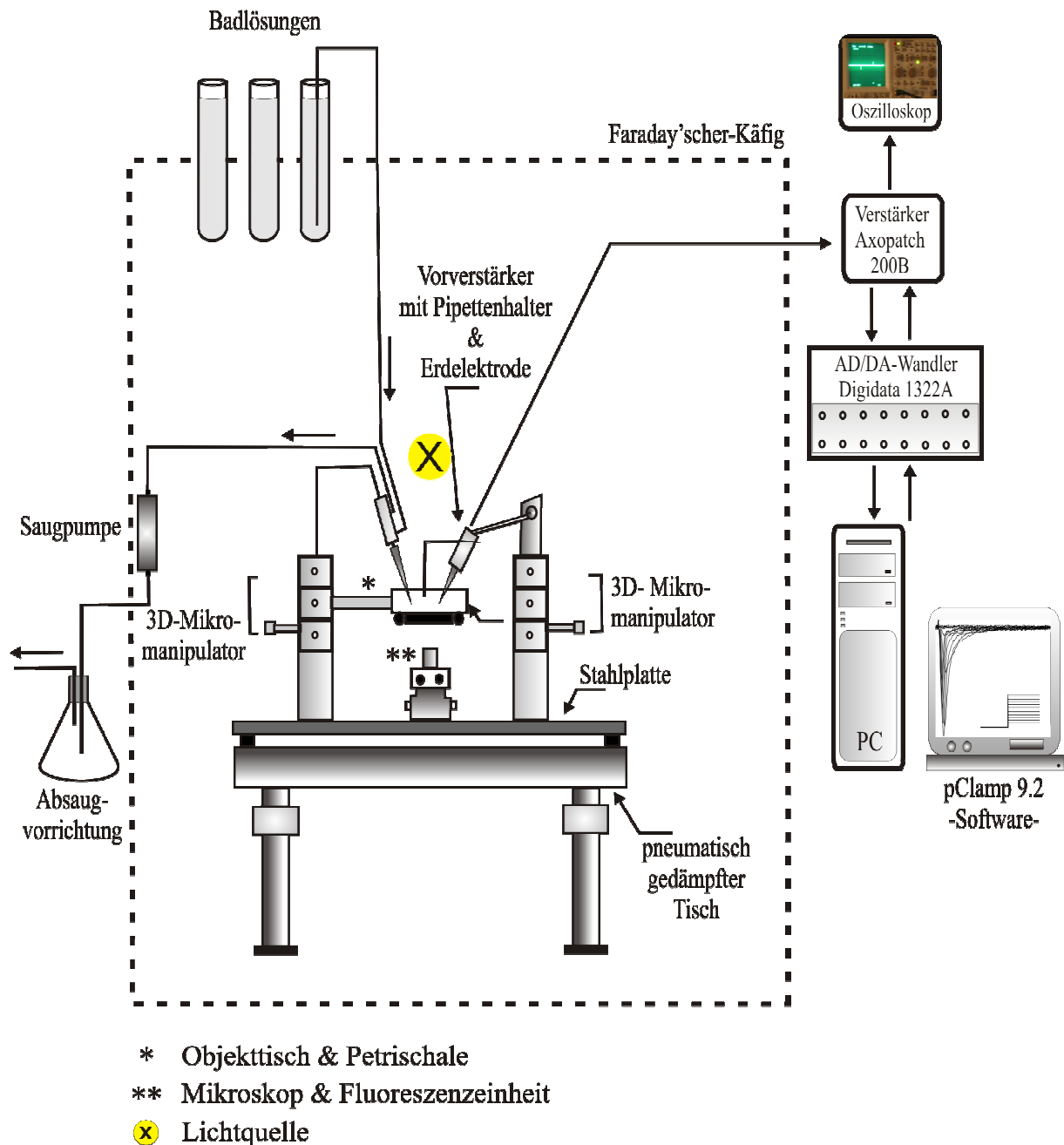


Abb. 2.3: **Schematische Darstellung des Patch-Clamp Setups.** Zur besseren Veranschaulichung ist der Großteil des inversen Mikroskops nicht abgebildet. Näheres siehe Text (Vorlage freundlicherweise zur Verfügung gestellt von D. Gremelle).

### **2.3.2.1 Störfaktoren**

Der gegenüber externen mechanischen und elektromagnetischen Störfaktoren äußerst empfindliche Patch-Clamp Aufbau wurde durch den Einsatz einer pneumatisch gedämpften Arbeitsplatte weitestgehend gegen mechanische Schwingungen abgeschirmt. Elektromagnetische Störsignale, wie beispielsweise das 50 Hz Netzbrummen, die die Experimente beeinflussen können, wurden durch Verwendung eines die Meßvorrichtung umgebenden Faraday'schen Käfigs reduziert. Aus dem gleichen Grund fand die Versorgung aller im Käfig befindlichen Verbraucher (Mikroskoplampe, LED) mit Gleichspannung statt. Essentiell war auch eine konsequente Erdung aller metallischen Teile und Geräte.

### **2.3.2.2 Verstärker und Software**

Verwendet wurde der Axopatch 200B-Verstärker in Kombination mit dem 16-Bit AD/DA-Wandler Digidata 1322A (A: analog, D: digital). Der Verstärker stellt die zentrale Einheit des Setups dar. Einerseits können durch ihn die Kommandospannungen vorgegeben werden, andererseits lassen sich automatische und manuelle Kompensationsvorgänge regulieren. Überdies misst und filtert er die ankommenden, analogen Daten. Der am Pipettenhalter angebrachte Vorverstärker (CV 203BU HEADSTAGE) dient der Amplifizierung der sehr kleinen Ströme, deren Signal/Rausch-Verhältnis unter anderem durch Einsatz einer Transistorkühlung ( $<0^{\circ}\text{C}$ ) zusätzlich optimiert wird. Des Weiteren ermöglicht der Vorverstärker die eigentliche Einspeisung der variablen Elektrodenpotentiale. Die Daten wurden mit einer Sampling-Frequenz von 20 kHz abgetastet und mit 5 kHz gefiltert (Bessel Lowpass-Filter). Unter Verwendung der pClamp9.2-Software ließen sich über den Verstärker als zentrale Schnittstelle folgende Operationen durchführen: Onlineaufzeichnung und -monitoring, Speicherung und Archivierung der digitalisierten Messwerte, Programmierung und Applikation der Kommandopotentiale (alle oben aufgeführten Geräte und Software von Molecular Devices/MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA).



### 2.3.2.3 Mikroskop

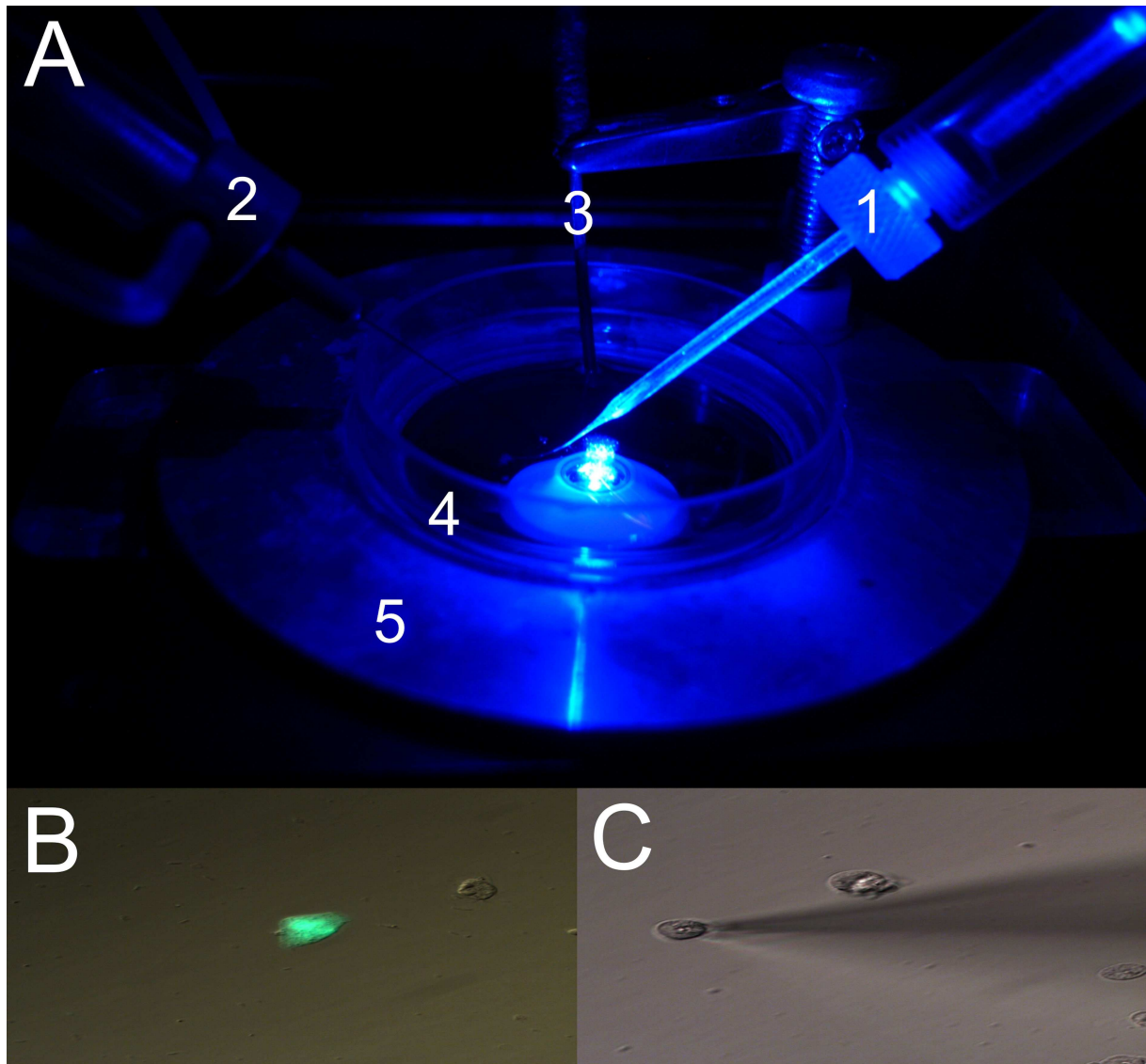


Abb. 2.2: **Typische Konfiguration eines Patch-Clamp Experimentes unter Fluoreszenzanregung.** **A)** Von rechts kommend, ist die im ca. 45°-Winkel in die Badlösung der Petrischale eingetauchte Pipette samt Pipettenhalter sichtbar (1), welcher an den Vorverstärker montiert ist. Etwa im gleichen Winkel, links verlaufend, ist das in die externe Lösung eingetauchte Perfusionsfilament erkennbar (2). Im Hintergrund befindet sich die mittels einer Krokodilklemme arretierte Erdelektrode (3). Zur Anregung des EGFP wird eine Diode mit  $\lambda = 475$  nm Wellenlänge (blau) verwendet. Die Petrischale (4) auf deren Boden die HEK293-Zellen festgesetzt sind, ist in einer Messkammer (5) am Objektisch fixiert. **B)** Durch Zuschaltung des EGFP-Filters wird die angeregte Emission von grünem Licht ( $\lambda = 507$  nm) der positiv mit EGFP kotransfizierten Zellen detektiert. Zum Vergleich ist rechts daneben eine untransfizierte HEK293-Zelle erkennbar. **C)** Nahaufnahme einer gepatchten HEK293-Zelle im Whole-Cell Modus; rechts, die konische Pipettenspitze außerhalb des Fokus mit der Intrazellulärlösung (Bilder B und C: Phasenkontrastaufnahmen mit einem Leica-Mikroskop [DMI3000B, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland] unter Verwendung einer Metall-Halid-Lichtquelle; freundlicherweise überlassen von A. Lampert).

Es wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 35, Zeiss, Jena) mit einer Hoffmann-Phasenkontrastoptik verwendet. Die Anregung des Markerproteins EGFP, ein aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliertes, fluoreszierendes Protein (Calfie et al.,

1994), erfolgte durch ein High-Power-LED Modul ( $\lambda = 475$  nm; Rapp Opto Electronic GmbH, Hamburg). Bei einem Anregungsmaximum von  $\lambda = 488$  nm (blau; Abb. 2.2 A) verschiebt EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) das Emissionsmaximum in den grünen Wellenlängenbereich nach  $\lambda = 507$  nm (Prasher et al., 1992; Cormack et al., 1996). Durch Zuschaltung eines EGFP-HQ-Filtersatzes (AHF Analysentechnik, Tübingen) konnte somit nach erfolgter Anregung die Fluoreszenz des Markerproteins EGFP sichtbar gemacht werden (s. Abb. 2.2 B). Zur Onlinedokumentation der gemessenen Zelle war an die Mikroskopoptik eine CCD-Kamera (Charge Coupled Device-Kamera; Model No.SSC-M370CE, Sony, Japan) angeschlossen, welche die digitalen Signale auf einen Schwarz-Weiß-Monitor (Model No.PVM-95E, Sony, Japan) überträgt. Diesem war ein PC (zur Photodokumentation) nachgeschaltet.

#### **2.3.2.4 Filament**

Anwendung fand ein selbstgebautes Y-Filament mit Magnetventilschaltung. Der Fluss erfolgte durch die Gravitation. Das ca. 50 mm lange, Polyamid-beschichtete Glasfaserfilament mit einem Innendurchmesser von 0.1 mm diente der Applikation der Badlösungen. Es wurde in einem sicheren Abstand zur ausgewählten Zelle auf gleicher Höhe wie diese platziert. Die Filamentöffnung sollte sich gerade außerhalb des bei 40x-Vergrößerung eingestellten Sichtfeldes befinden, um so keine den Seal beeinflussenden mechanischen Reize zu setzen und um hierbei keine Aktivierung mechanosensitiver Ionenkanäle zu induzieren. Der Zulauf war mit einem Schlauch verbunden, welcher die externe Lösung aus dem oberhalb des Meßplatzes befindlichen Applikationsgefäß aufnahm und via Filament die Zellen perfundierte (Abb. 2.3). Der an eine Saugpumpe angeschlossene Ablaufschlauch machte einen lokalen Austausch der Badlösung möglich. Grundsätzlich lassen sich zwei Funktionszustände des Filaments beschreiben. 1.) Die Öffnung des Ventils führt über das angeschlossene Vakuum zu einem Abfluss aus dem Applikationsgefäß in einen Vorratsbehälter. 2.) Im geschlossenen Zustand des Ventils erfolgt die Perfusion der Zellen in der Petrischale aus dem höher platzierten Applikationsgefäß.

### **2.3.2.5 Pipetten**

Mittels eines horizontalen Pipettenziehgerätes (DMZ-Universal Puller, Zeitz Instruments GmbH, München) wurden die in dieser Arbeit verwendeten Borosilikat-Glaskapillaren (GC150F-10, 1.5 mm Außen- und 0.86 mm Innendurchmesser, Harvard Apparatus LTD, Edenbridge, UK) zu jeweils zwei Pipetten gezogen und bei Bedarf anschließend hitzepoliert. Der angestrebte Pipettenwiderstand betrug 2-3 M $\Omega$ .

### **2.3.2.6 Elektroden**

Die verwendeten Pipetten- und Erdelektroden bestehen aus chloriertem Silberdraht. Dabei stellt die Pipettenelektrode die Verbindung des Vorverstärkers mit der Pipettenlösung her. Die Erdelektrode verbindet die Badlösung mit der Masse und dient als elektrische Referenzelektrode. Mittels Chlorierung lassen sich die an den verschiedenen Übergängen innerhalb der Messkette entstehenden Offset-Potentiale reduzieren. Vor der Chlorierung wurde die Drahtoberfläche mit feinem Sandpapier bearbeitet. Die hierdurch erreichte Befreiung von Staubpartikeln und Fett dient der besseren Haftung der Chlorid-Beschichtung. An die in einer 150 mM NaCl-Lösung eingetauchte Silberelektrode wurde für 30 min eine Gleichspannung von 9 V ( $I = \text{ca. } 1 \text{ mA}$ ) angelegt. Nach Schließung des Stromkreises durch Eintauchen eines Kathodendrahtes und der als Anode gepolten Silberelektrode können sich an dieser die Chloridionen anlagern.

### **2.3.2.7 Klimaanlage**

Ihr Einsatz erlaubte eine witterungs- und jahreszeitenunabhängige Messung unter thermisch konstanten Bedingungen. Dabei betrug die durchschnittliche Raumtemperatur 21°C.

## **2.4 Versuchsablauf**

### **2.4.1 Zellpräparation**

1-2 h vor der Messung wurden die trypsinisierten Zellen ausgesetzt (Abschnitt 2.1.6), um einen ausreichenden Anteil an einzeln liegenden, am Boden abgesetzten Zellen zu erhalten. Zur eigentlichen Messung wurden die Zellen in ihrer Petrischale aus dem Inkubator genommen, deren Medium durch zwei- bis dreimaliges Spülen mit externer Flüssigkeit ausgewaschen und anschließend durch circa 1 ml dieser Badlösung ersetzt.

### **2.4.2 Pipettenfüllung**

Die Applikation der internen Lösung in die Glaspipette geschah mit Hilfe einer 1 ml-Einmalspritze (Norm-Ject<sup>®</sup>), der ein Nylonspritzenfilter (Nalgene<sup>®</sup>) mit einer Porengröße von 0.2  $\mu\text{m}$  aufgesetzt war, an den sich ein dünnes Quartz-Filament (MicroFil<sup>®</sup>) anschloss. Die Pipette wurde zu etwa 1/6-1/10 ihrer Gesamtlänge luftblasenfrei befüllt, nach Einschub über die chlorierte Pipettenelektrode mit Hilfe eines Schraubgewindes am Pipettenhalter fixiert und durch Zwischenschaltung eines Dichtungsringes, zur Vermeidung eines Druckverlustes, versiegelt. Um das Auftreten von Offset-Potentialen zu minimieren, sollte nur der chlorierte Bereich der Silberelektrode Kontakt zur internen Flüssigkeit haben.

### **2.4.3 Zellauswahl**

Die Selektion der Zellen fand mit Hilfe eines 10x- bzw. 40x-Objektives wahlweise durch normales Auflicht oder unter Einsatz einer LED statt. Durch die Fluoreszenzeinrichtung ließen sich die mit EGFP transient kotransfizierten HEK293- bzw. N1E-Zellen detektieren. Die Erfahrung zeigt, dass separat liegende, mittelgroße bis kleine, runde Zellen, die vollständig am Boden haften, die besten Seal- und Meßeigenschaften bieten. Außerdem sollte ihre Oberfläche idealerweise keine Verzweigungen aufweisen, da dies die Anzahl der RC-Komponenten in der Zellmembran erhöht. Dabei bestünde das Problem, dass diese Komponenten bei

einer erfolgten Änderung der Kommandospannung erst mit umgeladen werden müssten (Abschnitt 2.4.4). Nach erfolgter Auswahl wurde die Zelle durch horizontale Verschiebung des Objektisches relativ zur Lichtquelle mit Hilfe eines 2D-Manipulators im eingeblendeten Fadenkreuz bei 40x-Vergrößerung zentriert.

#### **2.4.4 Erreichen eines Gigaseals**

Über ein angeschlossenes Drucksystem wurde ein leichter, konstanter Überdruck an die Pipette angelegt. Dies erfolgte zur Vermeidung einer Verschmutzung der Pipettenmündung. Mittels eines hydraulischen 3D-Mikromanipulators (Narishige MLW3, Tokyo) wurde die Pipettenspitze nach erfolgtem Eintauchen in die Badlösung nahe der Zelle positioniert. Generell sollte die Elektrode die Grenzfläche Luft/Wasser nur ein einziges Mal passieren. Ein manueller Nullabgleich am Verstärker diente der Kompensation des Pipettenoffsetpotentials. Dieser sollte vor dem Übergang in den Cell-Attached Mode vorgenommen werden, sobald sich die Pipettenspitze unmittelbar über der Zelle befindet. Mittels Einspeisung eines rechteckigen Testpulses war die Annäherung an die Zelle und die dadurch bedingte Zunahme des Pipettenwiderstandes durch die leichte Abnahme des Stromsignales am Oszilloskop (PM3215, Philips, Hamburg) erkennbar. Ausserdem führte der durch den Überdruck verursachte, kontinuierliche Flüssigkeitsausstrom aus der Elektrodenöffnung zu einer minimalen Deformation der Zelloberfläche, welches mitunter anhand eines Lichtreflexes wahrgenommen werden konnte. Die Cell-Attached Konfiguration wurde nun durch behutsame Anlage eines leichten Unterdruckes erreicht. Das so hergestellte Gigaseal war anhand einer weitgehend abgeflachten Stromspur erkennbar. Bei einer anliegenden Spannung von 10 mV und einem angenommenen Sealwiderstand von beispielsweise 1 G $\Omega$  betrug der Reststrom laut Ohm'schen Gesetz noch etwa 10 pA. Transiente Stromspitzen, die unter anderem durch die kapazitiven Ströme der Pipette (Kapazität des Elektrodenglases) bzw. des Pipettenhalters bedingt waren, ließen sich durch Regulation des  $\tau$ -fast Schalters am Verstärker (kosmetisch) kompensieren. Vor Übergang in den Whole-Cell Modus wurde in der Clampex 9.2<sup>®</sup>-Software von Sealtest auf Membrantest umgeschaltet. Dies war mit einer Änderung der anliegenden Kommandospannung verbunden, die im Bereich des Ruhemembranpotentials bei etwa -70 mV liegen sollte, um so eine

zu starke Zelldepolarisation zu vermeiden und gleichzeitig die Ausbildung eines Seals unter möglichst physiologischen Potentialen zu begünstigen. Durch Applikation eines kurzen, starken Unterdruckes ließ sich der Übergang in den Ganzzellmodus und die somit hergestellte, elektrisch leitende Verbindung zum Zytosol an dem plötzlichen Auftreten kapazitiver Ladeströme am Anfang und am Ende des rechteckigen Testpulses erkennen.

Das elektrische Ersatzschaltbild der Zellmembran besteht aus einer Parallelschaltung des Membrankondensators mit dem Eingangswiderstand (RC-Glied). Der Serienwiderstand, welcher zwischen dem Silberdraht der Elektrode und dem Zellinneren abfällt, befindet sich im Idealfall nur leicht über dem des Elektrodenwiderstandes, ist überdies jedoch meist durch die Elektrodenspitze verstopfende Membranfragmente deutlich erhöht. Ein vom Verstärker induzierter Strom wirkt sich nicht direkt auf das Zellmembranpotential aus, sondern geschieht mit einer zeitlichen Latenz, da zunächst der Membrankondensator auf-/umgeladen werden muss. Die Geschwindigkeit dieser Umladung wird maßgeblich vom Serienwiderstand bestimmt. Ist dieser stark erhöht, fällt über diesen Widerstand ein Teil der Spannung ab. Das geklemmte Potential kann nun nicht mehr erreicht werden; es resultiert ein Spannungsfehler. Aus diesem Grund erfolgte nach Erreichen des Whole-Cell Modus eine Einstellung der automatischen Serienwiderstandskompensation auf 75-80%, was eine beschleunigte Umladung der Membran bedingte. Durch manuelle Nachkompensation des Serienwiderstandes und der Kapazität wurde eine weitgehende Artefaktkompensation angestrebt.

Diesen Voreinstellungen konnte nun die eigentliche Messung folgen, welche frühestens 5 min nach Erreichen des Whole-Cell Modus begonnen werden sollte, da lediglich ein vorheriger Austausch des Zytosols mit der Pipettenlösung optimale Ausgangsbedingungen garantierte. Der Zugangswiderstand betrug typischerweise  $\leq 12 \text{ M}\Omega$ , bei von der Zellgröße abhängigen Kapazitäten im Bereich von 10-18 pF.

## 2.5 Messlösungen

Tab. 2.2: **Zusammensetzung der internen Lösungen.** Die Einstellung des pH-Wertes von 7,2 erfolgte durch Verwendung von KOH.

	<b>Pipettenlösung -Intern- (mMol/l)</b>		
	<b>HEK293</b>		<b>N1E-115</b>
	<i>KCNQ2/3</i>	<i>KCNQ1/E1</i>	<i>Na<sub>v</sub>-Kanäle</i>
NaCl	-	5	5
K-Glukonat	125	-	-
KCl	10	120	120
MgCl <sub>2</sub>	1,5	2	2
CaCl <sub>2</sub>	5	1	1
Hepes	10	10	10
EGTA	10	5	5
Na <sub>2</sub> -ATP	2	-	-

Die verwendeten Lösungen entsprachen in ihren Kalium- und Natriumionenkonzentrationen sowie ihren Osmolaritäten ungefähr den physiologischen Parametern eukaryotischer Zellen. Die Pipettenlösung entsprach im Whole-Cell Modus der Intrazellulärflüssigkeit, die externe Badlösung dem extrazellulären Milieu des zu messenden Zellverbandes. Zusätzlich zur normalen externen Lösung wurde bei den Messungen der KCNQ-Kanäle für die Tail-Ströme (Abschnitt 3.2) noch eine Lösung mit nahezu symmetrischer K<sup>+</sup>-Konzentration (Iso-K<sup>+</sup>) verwendet, um bei einem somit in Richtung Depolarisation verschobenen Gleichgewichtspotential eine möglichst große Stromamplitude bei negativen Potentialen zu generieren. Die Messungen der KCNQ2/3-Ströme in Neuroblastomzellen fanden unter Zugabe von 1 µM TTX (Tetrodotoxin) zur externen Lösung statt, um die intrinsisch in N1E-Zellen exprimierten Natriumströme zu inhibieren, welche sich störend auf die Kaliumkanalableitungen auswirken könnten. Die internen Pipettenlösungen wurden nach ihrer Herstellung in Eppendorf-Tubes mit jeweils 1 ml Inhalt aliquotiert, bei -20°C eingefroren und bedarfsweise aufgetaut. Vor Experimentbeginn wurden alle Lösungen auf Raumtemperatur gebracht.

Tab. 2.3: **Konfiguration der externen Lösungen.** Die physiologischen Lösungen wurden mit NaOH auf einen pH von 7,4 eingestellt, für die Iso-K<sup>+</sup>-Lösungen (150mM K<sup>+</sup>) wurde hierzu KOH verwendet.

<b>Badlösung -Extern- (mMol/l)</b>			
<b>HEK293</b>		<b>N1E-115</b>	
<i>KCNQ2/3 und KCNQ1/E1</i>		<i>Na<sub>v</sub>-Kanäle</i>	
	Physiologisch	Iso-K <sup>+</sup>	Physiologisch
NaCl	145	5	145
KCl	4	150	4
MgCl <sub>2</sub>	2	2	2
CaCl <sub>2</sub>	2	2	2
Hepes	10	10	10
D-Glukose	10	10	10
TEA	-	-	10

CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> dienen der Membranstabilisierung und verbessern die Sealbildungseigenschaften. HEPES puffert die Lösung, um den Einfluss der Protonen konstant zu halten. Der Einsatz von D-Glukose soll die Zellen vital halten. Das an Natrium gebundene ATP (Na<sub>2</sub>-ATP; Adenosin-Tri-Phosphat; Klöckner und Isenberg, 1992) dient der Energieversorgung der Zellen. EGTA (Ethylene glycol bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic-acid) ist ein Ca<sup>2+</sup>-spezifischer Chelator mit etwa 10<sup>3</sup>-fach niedrigerer Affinität zu Mg<sup>2+</sup> und dient der Einstellung des freien Ca<sup>2+</sup>. TEA (Tetra-Ethyl-Ammonium) inhibiert unselektiv Kaliumkanäle, was zur störungsarmen Messung der intrinsischen Natriumkanäle in N1E-Zellen verwendet wird.

## 2.6 Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von pClamp9.2<sup>®</sup> oder 10.2<sup>®</sup> (Clampfit, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Die anschließende graphische Darstellung und die statistischen Analysen erfolgten mit der OriginPro 7G<sup>®</sup> oder 8G<sup>®</sup>-Software (OriginLab Corporation, Northhampton, MA, USA). Bei einem Vergleich von lediglich zwei Gruppen wurde ein gepaarter Student's t -Test angewendet. Bei mehr als zwei zu testenden Gruppen erfolgte eine einwegige Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit



anschließendem Mittelwertvergleich nach Tukey. Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (S.E.M.: Standard Error of the Mean) dargestellt. Signifikant waren Ergebnisse mit  $p < 0.05$ .

## 2.7 Elektrophysiologische Parameter

Die Steady-State Aktivierung und Inaktivierung stellen zwei wichtige Parameter zur Beschreibung der elektrophysiologischen Eigenschaften von Ionenkanälen dar. Dabei bringt man die Kanäle durch einen langanhaltenden Vorpuls einer bestimmten Spannung in einen definierten Ausgangszustand (Steady State). Anschließend wird die Reaktion der Ströme bei unterschiedlichen Spannungen (V) untersucht. Um die spannungsabhängige Aktivierung zu erfassen, müssen die Spitzenströme (I) in die entsprechenden Leitfähigkeiten (G) transformiert werden (Gleichung 1), um sie anschließend mittels einer Boltzmann-Funktion (Gleichung 2) zu beschreiben. Zwei essentielle Parameter, die sich aus der Boltzmann-Funktion ergeben, sind der Steilheitsfaktor k (Slope) und das halbmaximale Potential  $V_{0.5}$ , bei dem die Hälfte aller am Gesamtstrom beteiligten Kanäle ihre Ausgangskonformation geändert haben.

Die Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken beschreiben den zeitlichen Verlauf der Kanalöffnungen und -schließungen und lassen sich mit Hilfe der Zeitkonstanten  $\tau_i$  und den zugehörigen Fraktionen  $A_i$  beschreiben (Gleichung 3).

Berechnung der Leitfähigkeiten:

$$G = \left( \frac{I}{V - E_{rev}} \right) \quad (\text{Gleichung 1})$$

Das Umkehrpotential  $E_{rev}$  ist Ionenkanal-spezifisch und lässt sich anhand der Nernst'schen Gleichung (siehe Hille, 2001) ermitteln.

Allgemeine Boltzmann-Funktion:

$$\frac{G}{G_{max}} = \frac{I}{1 + \exp\left(\frac{V_{0.5} - V}{k}\right)} \quad (\text{Gleichung 2})$$

Exponentialfunktion n-ter Ordnung:

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} + k \quad (\text{Gleichung 3})$$

$A_i$  = Amplituden der Transienten

$\tau_i$  = Zeitkonstanten

$k$  = Offsetparameter

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Effekte von BACE1 auf $\text{Na}_v$ -Ströme in N1E-115 Zellen

##### 3.1.1 BACE1 beeinflusst die Natriumkanalaktivierung

In einer ersten Versuchsreihe sollte die Wirkung der  $\beta$ -Sekretase (BACE1) auf spannungsgesteuerte Natriumkanäle ( $\text{Na}_v$ ) untersucht werden. Nach derzeitigen Erkenntnissen stellt der amyloidogene Pathway (Abschnitt 1.3.1.1), der über die BACE1 führt, einen entscheidenden Pathogenitätsfaktor in der Entstehung der Alzheimer'schen Erkrankung (AD) dar (Cole und Vassar, 2007a, b). Dies geht zum Teil mit Befunden einer gesteigerten Enzymaktivität und erhöhter Expressionsdichten der BACE1 im hippocampalen und kortikalen Hirngewebe von AD-Patienten einher (Yang et al, 2003). Um eine mögliche Interaktion mit den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der Natriumkanäle zu untersuchen, habe ich die murine BACE1 transient in N1E-115 Neuroblastomzellen überexprimiert und deren intrinsische Natriumströme mittels der Whole-Cell Patch-Clamp Technik gemessen.

Abb. 3.1 A zeigt die für spannungsabhängige Natriumkanäle charakteristische Stromantwort auf das im Inset abgebildete Treppenprotokoll. Die zunehmende Depolarisierung bewirkte eine vermehrte Aktivierung der Kanäle. Diesem schloss sich eine schnelle Inaktivierung der Kanäle an, wodurch der Strom rasch abnahm. Mit zunehmender Depolarisation reduzierte sich das treibende Potential, was sich ab einer bestimmten Spannung in einer stetigen Reduktion der Stromspitzen äußerte. Die Applikation von 1  $\mu\text{M}$  des spezifischen Natriumkanalinhibitors Tetrodotoxin (TTX) bewirkte die für TTX-sensitive Natriumkanäle charakteristische Hemmung des Stroms (Inset der Abb. 3.1 A).

Wie im Methodenteil beschrieben (Abschnitt 3.3.2.1), wurden aus den gemessenen Stromtransienten die entsprechenden Aktivierungskurven konstruiert (Abb. 3.1 B) und die beiden Parameter  $V_{0.5}$  für die halbmaximale Aktivierung und der Slopefaktor  $k$  bestimmt. Das Umkehrpotential  $E_{\text{rev}}$  zur Ermittlung der Leitfähigkeit  $G$  betrug unter unseren Meßbedingungen laut Nernst' scher Gleichung für die  $\text{Na}_v$ -Kanäle +86.3 mV.

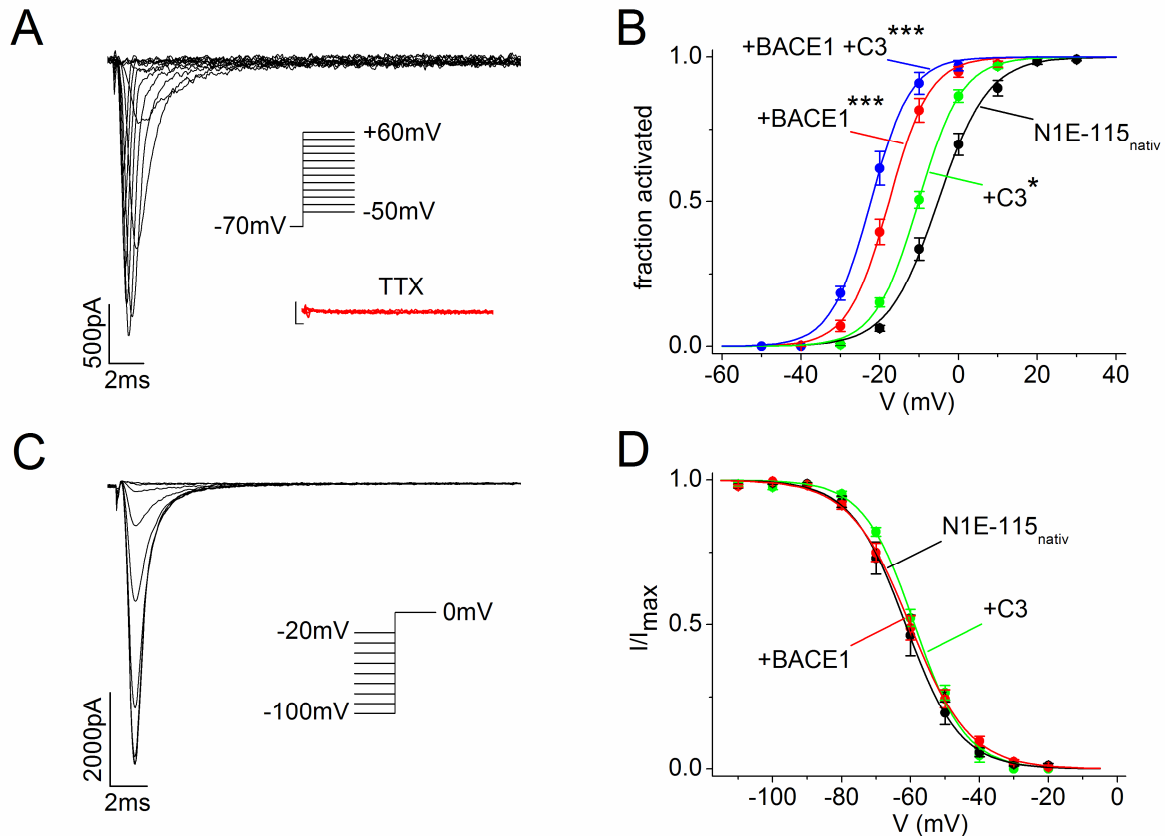


Abb. 3.1: **Einfluss von BACE1 auf intrinsische Natriumkanäle.** Whole-Cell Ableitungen von intrinsischen  $\text{Na}_v$ -Strömen in murinen N1E-115-Zellen mit und ohne transienter Überexpression der mBACE1 und deren Inhibition durch den BACE1-Inhibitor C3 **A)** Typische Messung einer  $\text{Na}_v$ -Aktivierungskurve, welche anhand des im Inset dargestellten Spannungsprotokolls generiert wurde. Die Dauer des Vorpulses betrug 2 s. Die im Inset dargestellte Kontrollmessung veranschaulicht die Reduktion der Natriumstromamplitude nach Applikation von 1  $\mu\text{M}$  TTX (rot; gleiche Dimensionierung der Legende wie bei den unbehandelten Strömen). **B)** zeigt die Aktivierungskurven der intrinsischen Natriumkanäle. Die Aktivierungskurven wurden aus Messungen wie in A) erstellt, normalisiert und mit einem Boltzmann-Fit angepasst. **C)** Exemplarische Stromverläufe während der Steady-State-Inaktivierung von Natriumkanälen nach Anwendung des im Inset dargestellten Treppenprotokolls. Die Dauer der variablen Vorpulse betrug 1 s. **D)** zeigt Inaktivierungskurven der Natriumkanäle, welche mittels Normierung der einzelnen Spitzenströme auf die maximale Amplitude der Spitzenströme gewonnen und anschließend mit einem Boltzmann-Fit angepasst wurden. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Bei Überexpression von BACE1 wies  $V_{0.5}$  der nativen  $\text{Na}_v$ -Ströme in N1E-Zellen eine signifikante Verschiebung der Aktivierungskurve in Richtung Hyperpolarisation auf. Dabei betrug  $V_{0.5}$  für die Natriumströme unter Kontrolle  $-5.1 \pm 1.1$  mV, bei  $k = 6.4 \pm 0.3$  mV ( $n = 12$ ). Bei einer Überexpression mit BACE1 betrug  $V_{0.5} = -17.4 \pm 1.0$  mV;  $k$  verhielt sich mit  $5.2 \pm 0.2$  mV ( $n = 21$ ) nicht signifikant unterschiedlich.

Als Kontrolle dienten Messungen an nativen N1E-Zellen, die zusätzlich zu der BACE1-Überexpression mit Compound 3 (C3; Piazzini et al., 2008; Silvestri, 2009; Malamas et al., 2009) präinkubiert wurden. Die Aktivierungskurven des  $\text{Na}^+$ -Stroms

unter Einfluss der durch C3 inaktivierten BACE1 zeigten, wie auch in Anwesenheit ihres aktiven Pendants gemessen, eine Linksverschiebung in Richtung Hyperpolarisation ( $V_{0.5} = -21.9 \pm 1.3$  mV,  $k = 5.1 \pm 0.3$  mV,  $n = 10$ ). Dabei verlagerte die inaktivierte BACE1 die Natriumkanalaktivierung signifikant weiter in Richtung negativer Potentiale, als es bei alleiniger Überexpression mit BACE1 zu beobachten war ( $p = 0.03$ ). Um einen möglichen Eigeneffekt des C3 auszuschließen, wurden die nativen N1E-Zellen mit diesem inkubiert. Auch hier resultierte eine leichte, aber signifikante Linksverschiebung ( $p = 0.02$ ) der nativen Natriumstromkurven ( $V_{0.5} = -10.1 \pm 0.6$  mV,  $k = 5.5 \pm 0.2$  mV,  $n = 12$ ).

Die gemessene N1E-Zelllinie exprimiert nachweislich signifikante Level der endogenen BACE1 (Huth et al., 2009). Der unter C3-Einwirkung beobachtete Effekt auf die Aktivierung der  $Na_v$ -Ströme ließe sich durch Inhibition der endogenen BACE1 erklären und diene somit als indirekter Nachweis einer intrinsischen BACE1-Expression (s. Abschnitt 4.1).

Verglichen mit dem unbehandelten  $Na^+$ -Strom bewirkten die Inkubation mit C3 und die Überexpression mit BACE1 und C3 in einem mittleren Potentialbereich (-20 mV bis +20 mV) jeweils einen größeren Anteil an funktionell verfügbaren  $Na^+$ -Strömen.

### 3.1.2 BACE1 hat keinen Einfluß auf die Natriumkanalinaktivierung

Die Steady-State Inaktivierung des schnellen Natriumstroms ist in Abb. 3.1 C exemplarisch dargestellt. Der Strom wurde durch das im Inset abgebildete Spannungsprotokoll generiert. Mit zunehmender Depolarisation des Vorpulses nahm der Anteil aktivierbarer Kanäle im Testpuls ab, was sich in einer stetigen Reduktion der induzierbaren Spitzenströme äußerte.

In Abb. 3.1 D sind die Inaktivierungskurven abgebildet. Weder eine Vorbehandlung der nativen N1E115-Zellen mit C3, noch eine transiente Überexpression mit der BACE1 zeigten einen signifikanten Einfluss auf das Steady-State-Inaktivierungsverhalten der  $Na_v$ -Kanäle.  $V_{0.5}$  der nativen Natriumströme betrug

-61.4±0.4 mV, bei  $k = 7.9 \pm 0.4$  mV ( $n = 12$ ). Durch Inhibition der intrinsischen BACE1 mit C3 betrug  $V_{0.5} = -58.3 \pm 0.6$  mV und  $k = 7.6 \pm 0.5$  mV ( $n = 8$ ). Bei transienter BACE1-Überexpression der N1E-Zellen war  $V_{0.5} = -60.2 \pm 0.4$  mV und  $k = 8.8 \pm 0.4$  mV ( $n = 25$ ).

### 3.1.3 BACE1 beeinflusst die Erholung der Natriumkanäle von der Inaktivierung

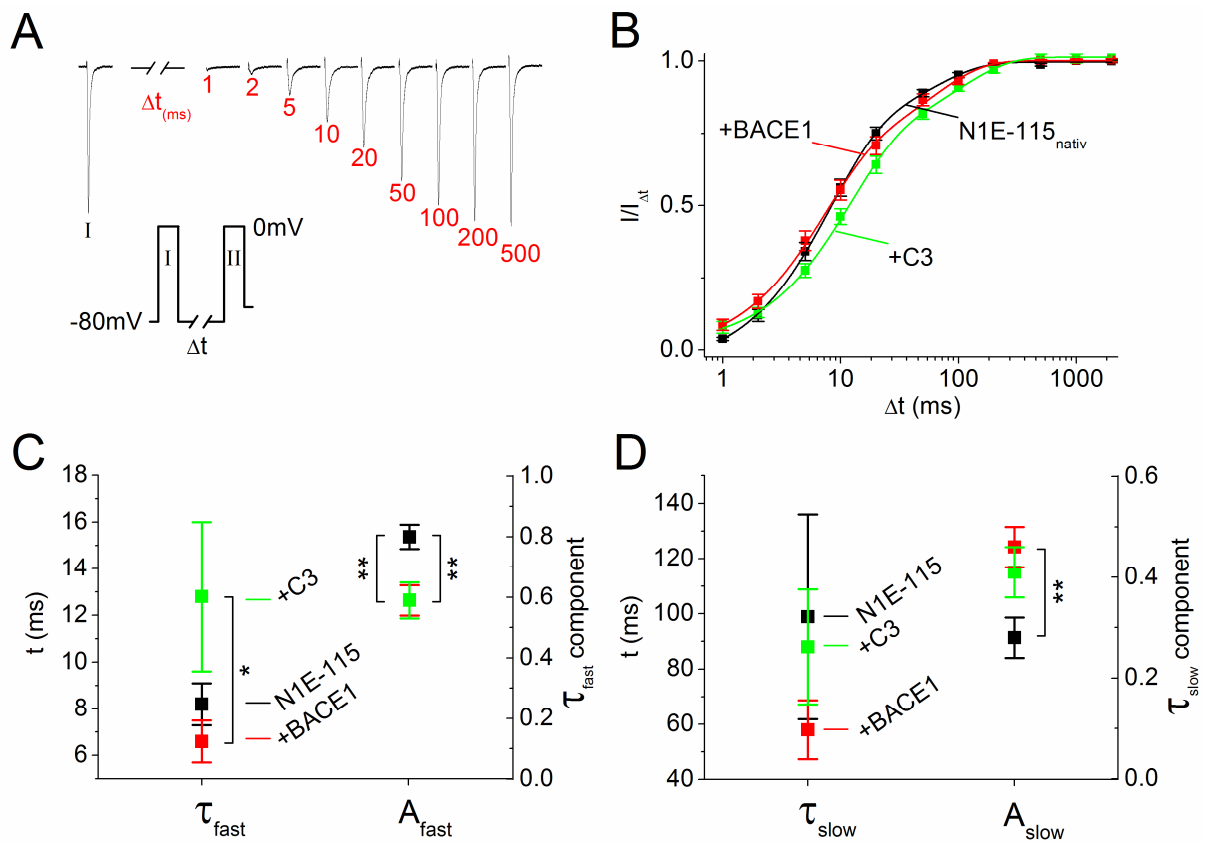
Ein weiterer wichtiger Parameter zur Charakterisierung von Whole-Cell Natriumströmen ist die Bestimmung der für die Erholung von der Inaktivierung benötigten Zeit (Recovery). Abb. 3.2 A zeigt die Registrierung der Natriumströme als Antwort auf das im Inset gezeigte Recovery-Protokoll. Die nach Ablauf der variablen Erholungszeiten aus der Inaktivierung gemessenen Ströme wurden in Abb. 3.2 B gegen  $\Delta t$  aufgetragen. Hier zeigte sich der Anteil an nach fortschreitender Erholungsdauer wieder aktivierbaren Kanälen, welches sich in einer Zunahme der Spitzenströme des zweiten Spannungspulses äußerte. Eine Quantifizierung der ermittelten Recovery-Kurven anhand einer schnellen und einer langsamen Komponente fand durch einen bi-exponentiellen Fit statt. Die mit den Zeitkonstanten korrespondierenden Amplitudenfraktionen  $A_{fast}$  und  $A_{slow}$  beschreiben den Anteil des nach Ablauf von  $\tau_{fast}$  und  $\tau_{slow}$  jeweils wieder induzierbaren Stroms aus der Inaktivierung.

Tabelle 3.1: **Elektrophysiologische Parameter der Recovery der  $Na^+$ -Kanäle in N1E-Zellen unter Einfluss der mBACE1.** Die p-Werte sind in Relation zur Kontrollsituation ( $Na_v1$  in N1E-115) aufgetragen. \*\* $p < 0.01$ .

Konstrukt	Recovery				
	$\tau_{fast}$ (ms)	$A_{fast}$	$\tau_{slow}$ (ms)	$A_{slow}$	n
<i>Na<sub>v</sub>1 in N1E-115</i>	8.2±0.9	0.80±0.04	98.9±37.1	0.28±0.04	16
<i>+mBACE1</i>	6.6±0.9	0.59±0.05**	58.0±10.7	0.46±0.04**	16
<i>+C3</i>	12.8±3.2	0.59±0.06**	88.0±20.8	0.41±0.05	12

Abb. 3.2 B zeigt die Verfügbarkeiten der Natriumströme aus der Inaktivierung, deren Parameter in Abb. 3.2 C und D aufgetragen sind. Dabei ließen sich anhand der Abb. 3.2 C bzw. D und der Tabelle 3.1 von der BACE1-Aktivität abhängige Erholungszeiten der Natriumkanäle aus der Inaktivierung beobachten. Gegenüber dem Wildtyp bewirkte eine Überexpression der N1E-Zellen mit BACE1 eine anhand der Parameter  $\tau_{fast}$  und  $\tau_{slow}$  erkennbare Beschleunigung der Erholung. Die

entsprechenden Amplitudenfraktionen  $A_{\text{fast}}$  und  $A_{\text{slow}}$  verhielten sich signifikant unterschiedlich. Verglichen mit einer BACE1-Überexpression hatte die Inhibition der in N1E-Zellen endogen exprimierten BACE1 durch Compound 3 (C3) eine Verzögerung der Erholung zur Folge. Dabei war die schnelle Zeitkonstante der Erholung ( $\tau_{\text{fast}}$ ) unter C3-Präinkubation gegenüber der bei BACE1-Überexpression signifikant ( $p < 0.05$ ), die langsame Zeitkonstante ( $\tau_{\text{slow}}$ ) lediglich tendenziell verlangsamt, bei sich nicht unterschiedlich verhaltenden Anteilen beider Recoverykomponenten ( $A_{\text{fast}}$  und  $A_{\text{slow}}$ ).



**Abb. 3.2: Einfluss der BACE1 auf die Recovery der  $\text{Na}_v$ -Kanäle von N1E-Neuroblastomzellen.** Whole-Cell Messungen der  $\text{Na}_v$ -Ströme in N1E-115-Zellen mit (rot) und ohne (schwarz) transienter Überexpression der mBACE1 sowie deren Inhibition durch C3 (grün). **A)** Mit Hilfe des im Inset gezeigten Doppelpulsprotokoll mit variablen Zeitintervallen ( $\Delta t$  [ms]; rot) zwischen den jeweils 15 ms dauernden, depolarisierenden Testpulsen I und II kann die Erholung aus der Inaktivierung bestimmt werden. In **B)** sind die einzelnen Verläufe der Erholung abgebildet. Der jeweils nach der Inaktivierung gemessene Spitzenstrom  $I_{\Delta t}$  des zweiten Pulses wurde auf den vom ersten Puls verursachten Spitzenstrom  $I_1$  (Puls I in A) normiert und gegen die variable Intervalldauer aufgetragen. Der Kurvenverlauf der Datenpunkte ließ sich mit einer Exponentialfunktion 2. Ordnung beschreiben. Die anhand des durchgeführten Fits erhobenen Parameter ( $\tau_{\text{fast}}$  und  $A_{\text{fast}}$  bzw.  $\tau_{\text{slow}}$  und  $A_{\text{slow}}$ ) sind in **C)** bzw. **D)** dargestellt. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

### 3.2 Stromcharakteristika spannungsgesteuerter KCNQ2- und KCNQ3-Kanäle

Um die im Folgenden untersuchten KCNQ2- und KCNQ3-Ströme charakterisieren zu können, soll im Rahmen dieses Abschnittes auf deren elektrophysiologischen Eigenschaften und die Auswertung dieser Ströme eingegangen werden. Abb. 3.3 A zeigt den für HEK293-Zellen typischen, intrinsischen Auswärtsstrom nach Anlage des im Inset gezeigten Protokolls. Dem 1.5 s dauernden Vorpuls folgten die variablen Depolarisationsschritte. Dabei wurden Lösungen mit physiologischen Kalium- und Natriumkonzentrationen verwendet.

Das im Anschluss an die variablen Treppentpulse angelegte Haltepotential bei -40 mV diente der Generierung der in Abb. 3.3 B bis D sichtbaren, langsamen Tail-Ströme, welche für die verwendeten KCNQ-Kanäle charakteristisch waren und sich dementsprechend nicht in den Stromkurven untransfizierter HEK293-Zellen (Abb. 3.3 A) finden ließen.

Die Bestimmung der Aktivierungskinetik der KCNQ-Ströme ist im Inset der Abb. 3.3 B exemplarisch durch einen monoexponentiellen Fit einer Originalstromspur des KCNQ2-Monomers bei Aktivierung durch einen Depolarisationsschritt auf -10 mV dargestellt.

Anhand der Abbildungen 3.3 B bis D zeigte sich auch die typische Eigenschaft der KCNQ2- und KCNQ3-Kanäle, bei anhaltender Depolarisation der Membran langsam zu aktivieren und anschließend in einen Sättigungszustand überzugehen (Steady-State). Dieser war in den Originalstromableitungen anhand des horizontalen Verlaufes der Stromamplituden erkennbar.

Eine Überexpression mit KCNQ2 führte zu dem charakteristischen langsamen Aktivierungsverlauf der Ströme in Abb. 3.3 B mit einer, im Vergleich zu den intrinsischen Auswärtsströmen in Abb. 3.3 A deutlich erhöhten Amplitude.

Verglichen mit den KCNQ2-Strömen zeigte eine Überexpression der KCNQ3-Monomere in Abb. 3.3 C die typischerweise beschleunigt ablaufende Aktivierung bei insgesamt kleinerer Amplitude.



Abb. 3.3 D zeigt die charakteristischen Auswärtsströme des heteromeren Konstruktes KCNQ2/3 (cDNA-Transfektionsratio von 1:1). Im Vergleich zu den Homomeren waren die Stromamplituden der KCNQ2/3-Konstrukte typischerweise deutlich größer.

Die Leitfähigkeitskurve (G) in Abb. 3.3 E beschreibt die Spannungsabhängigkeit der Ströme (I) zum Zeitpunkt ihrer vollständigen Aktivierung bei konstanten Potentialen. Das Umkehrpotential  $E_{rev}$  zur Ermittlung der entsprechenden Leitfähigkeiten der KCNQ2- und KCNQ3-Kanäle betrug hier laut Nernst'scher Gleichung -90.2 mV. Die aus den Strömen konstruierten Aktivierungskurven wiesen idealerweise einen sigmoidalen Verlauf auf (Abb. 3.3 E und F). Mittels eines Boltzmann-Fits (Abb. 3.3 F) ergaben sich die zur Beschreibung der Aktivierung verwendeten Parameter  $V_{0.5}$  und  $k$ .

Als Ausschlusskriterien für eine verwertbare Messung galten in dieser Arbeit ein Nicht-Erreichen des Steady-State Zustands in den Originalstromableitungen, ein nach Erreichen des Leitfähigkeitmaximums  $G_{max}$  wieder deutlicher Abfall der Leitfähigkeitskurve um  $>1/3$  der maximalen Leitfähigkeit (stärker als in Abb. 3.3 E), sowie das Auftreten eines nicht-sigmoidalen, beispielsweise linearen Leitfähigkeitsverlaufes, ohne in einen Sättigungszustand überzugehen.

Die anhand des Beispiels in Abbildung 3.3 E zu beobachtende, wieder abfallende Sättigung bei Potentialen jenseits von +30 mV befand sich noch innerhalb des definierten Toleranzbereiches. Die entsprechenden Datenpunkte nach Erreichen der maximalen Sättigung wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen (siehe Abb. 3.3 F; Verwendung der Datenpunkte aus E nur bis +30 mV).

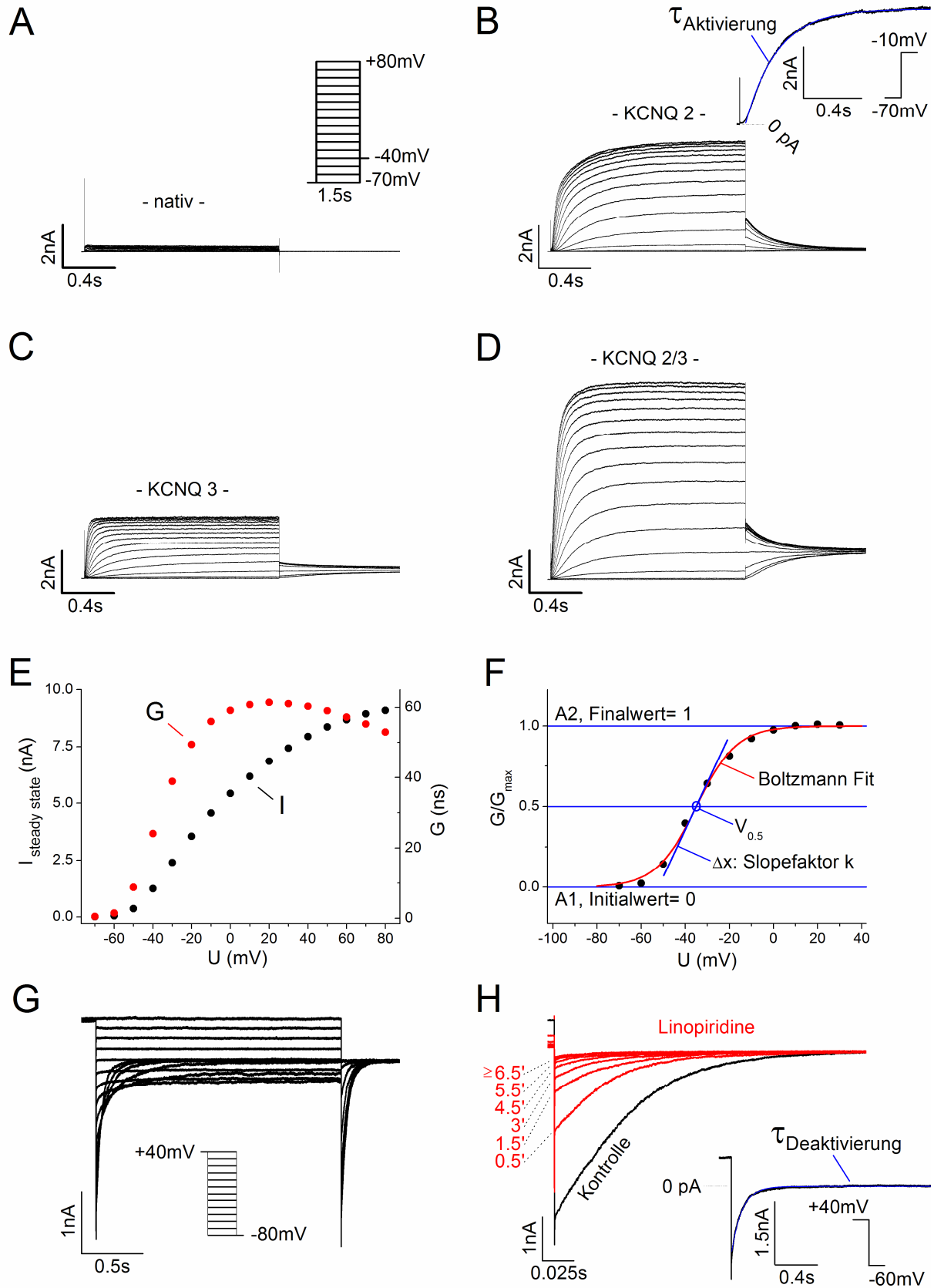


Abb. 3.3: Charakteristische elektrophysiologische Parameter von KCNQ2- und KCNQ3-Kanälen bei transienter Überexpression in HEK293-Zellen. Erläuterung siehe Text.

Abb. 3.3 G zeigt die typischen Tail-Ströme von heteromeren KCNQ2/3-Kanälen zur Bestimmung der Deaktivierungskinetik unter Verwendung einer annähernd gleich hohen Kaliumkonzentration der extra- und intrazellulären Lösung. Diese unphysiologische Konzentrationsangleichung bewirkte einen Anstieg des Umkehrpotentials  $E_{rev}$  für Kaliumionen von vormals -90.2 mV (unter physiologischer Badlösung) auf +2.7 mV, was die Generierung einer möglichst großen Amplitude des Kaliumeinstromes bei Anlage von negativen Potentialen begünstigte. Erzeugt wurden die Ströme durch das im Inset der Abb. 3.3 G gezeigte Spannungsprotokoll bei einer Vorpulsdauer von 1 s. Die anhand der Tail-Ströme ermöglichte Beschreibung der Deaktivierungskinetik fand unter Verwendung einer Exponentialfunktion 1. Ordnung statt (Inset der Abb. 3.3 H).

Abb. 3.3 H zeigt einen vergrößerten Maßstab des Zeitverlaufs aus Abb. 3.3 G. Die Wirkung des spezifischen KCNQ2/3-Inhibitors Linopiridine (10  $\mu$ M) diente als Kontrolle der Transfektion mit KCNQ2/3-Kanälen. Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle der gleichen Zelle (schwarz) ist deren Amplitudenabfall bei Anlage eines jeweils gleichen Testpuls-niveaus nach den in min (rot) angegebenen Einwirkzeiten von Linopiridine aufgetragen. Nach 0.5 min waren ca. 50% der die Tail-Ströme generierenden KCNQ2/3-Kanäle blockiert. Nach 6.5 min waren die KCNQ2/3-Kanäle nahezu komplett inhibiert, was anhand der beinahe vollständig reduzierten Stromamplitude veranschaulicht wird. Der verbliebene Strom setzte sich aus einem kleinen Restanteil nicht inhibierter KCNQ2/3-Ströme und aus in HEK293-Zellen endogen exprimierten Strömen zusammen.

### 3.3 Einfluss von Na<sub>v</sub> β2- und β4-Untereinheiten auf KCNQ2- und KCNQ3-Ströme in HEK293-Zellen

Die folgenden Versuche fanden in Anlehnung an in diesem Labor gewonnenen Ergebnissen aus Koexpressionsexperimenten in HEK293-Zellen statt. Eine transiente Kotransfektion der α-Untereinheiten von Natriumkanälen (Na<sub>v</sub>1.2 α) mit akzessorischen β-Untereinheiten spannungsgesteuerter Kaliumkanäle (KCNE1) führte zu einer signifikanten Verschiebung der Na<sub>v</sub>1.2-Aktivierungskurve in Richtung Hyperpolarisation (Daten von K. Schmidt-Neuenfeldt, unveröffentlicht).

Im Gegensatz zu den Na<sub>v</sub> 1.2-Kanälen lassen sich im neuronalen Gewebe keine signifikanten Level der KCNE1-Untereinheiten nachweisen (Ohya et al., 2002; McCrossan und Abbott, 2004). Aufgrund einer fehlenden Überlappung der Expression beider Untereinheiten scheint eine möglicherweise daraus resultierende, die Kanalspezies übergreifende, funktional relevante Interaktion in vivo eher unwahrscheinlich. Eine genauere Untersuchung der KCNE1 β-Untereinheiten, deren endogene Expression zusammen mit KCNQ1 (K<sub>v</sub>7.1) für die kardiale Repolarisation funktionelle Bedeutung hat und deren mögliche Beeinflussung durch die BACE1 wird im Abschnitt 3.6 behandelt.

Zwei weitere Vertreter aus der mit den KCNE1-Untereinheiten interagierenden K<sub>v</sub>7-Familie sind die KCNQ2- und KCNQ3-Kanäle (K<sub>v</sub>7.2 und K<sub>v</sub>7.3). Diese weisen ein neuronales Expressionsmuster auf (Gutman et al., 2005) und organisieren sich topologisch eng mit den Na<sub>v</sub>1.2-Kanälen zusammen innerhalb sogenannter initialer Axonsegmente (AIS; Axonal-Insertion-Segments) zentraler und peripherer Neurone (Chung et al., 2006), welches die Möglichkeit einer eventuell vorhandenen Interaktion der beiden Ionenkanalspezies unterstreicht. In diesem Kontext scheint eine von Deschênes und Tomaselli (2002) im Expressionssystem beobachtete Modulation spannungsabhängiger Kaliumkanäle durch β-Untereinheiten von Natriumkanälen besonders interessant zu sein (näheres in Abschnitt 4.2).

Die folgenden Experimente beschäftigten sich mit der Fragestellung, ob die humanen KCNQ2/3-Ströme durch die humanen β2- und β4-Untereinheiten spannungsgesteuerter Natriumkanäle (Na<sub>v</sub> β2 und Na<sub>v</sub> β4) beeinflusst werden können. Die hKCNQ2- und hKCNQ3-Konstrukte wurden jeweils als Homomere

beziehungsweise als Heteromere mit und ohne den  $\text{Na}_v$   $\text{h}\beta 2$ - und  $\text{m}\beta 4$ -Untereinheiten transient in HEK293-Zellen transfiziert und deren Ströme quantifiziert. Eine proteolytische Prozessierung der  $\text{Na}_v$   $\text{h}\beta 2$ - und  $\text{m}\beta 4$ -Untereinheiten durch die humane BACE1 und die daraus möglicherweise resultierende, veränderte Modulation der  $\text{hKCNQ2}$ - und  $\text{hKCNQ3}$ -Ströme wird in Abschnitt 3.4 behandelt.

### 3.3.1 Einfluss von $\text{Na}_v$ $\beta 2$ -Untereinheiten auf heteromere $\text{KCNQ2/3}$ -Kanäle

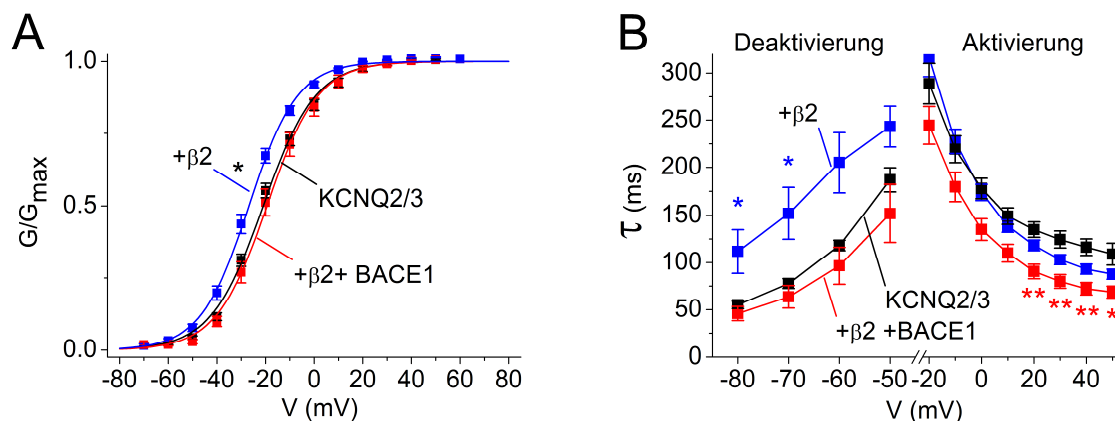


Abb. 3.4: Einfluss der  $\text{Na}_v$   $\text{h}\beta 2$ -Untereinheit und der  $\text{hBACE1}$  auf  $\text{hKCNQ2/3}$ -Ströme.

**A)** Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von  $\text{hKCNQ2/3}$ -Kanälen mit und ohne transiente Überexpression der  $\text{Na}_v$   $\text{h}\beta 2$ -Untereinheiten sowie  $\text{hBACE1}$  in HEK293-Zellen. Die Aktivierungskurven wurden aus Messungen wie in Abb. 3.3 D erstellt und mit einem Boltzmann-Fit angepasst. **B)** Zeitkonstanten der Aktivierung und Deaktivierung von  $\text{hKCNQ2/3}$  allein bzw. bei Kotretransfektion mit den humanen  $\text{Na}_v$   $\beta 2$ -Untereinheiten mit und ohne  $\text{hBACE1}$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Eine Koexpression von  $\text{KCNQ2/3}$  mit der  $\beta 2$ -Untereinheit des Natriumkanals (blau;  $V_{0.5} = -26.9 \pm 1.2$  mV;  $k = 10.2 \pm 0.2$  mV,  $n = 18$ ) in Abb. 3.4 A) zeigte im Vergleich zur  $\text{KCNQ2/3}$ -Kontrolle (schwarz;  $V_{0.5} = -20.7 \pm 1.2$  mV;  $k = 10.8 \pm 0.4$  mV,  $n = 19$ ) eine signifikante Linksverschiebung der Aktivierungskurve um 6.2 mV in Richtung Hyperpolarisation ( $p = 0.044$ ). Die Reversibilität dieses Effektes unter Einfluss der  $\text{BACE1}$  (rot) und deren Auswirkung auf die Kinetiken werden im Abschnitt 3.4 näher beschrieben.

Die mittels eines monoexponentiellen Fits der Originalstromkurven (siehe Inset der Abb. 3.3 B und Abschnitt 3.3.1.1) bestimmten Aktivierungskinetiken der  $\text{KCNQ2/3}$ -Kanäle sind zusammen mit den entsprechenden Verläufen der Deaktivierung (Fit im Inset der Abb. 3.3 H in Abb. 3.4 B) dargestellt. Dabei verhielt sich die

Aktivierungskinetik der KCNQ2/3-Ströme (schwarz) nicht unterschiedlich zu der Aktivierungskinetik der KCNQ2/3-Ströme unter Koexpression mit den Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten (blau). Zur Einsicht der Zeitkonstanten sei im Folgenden auf Tab. 6.3 im Anhang verwiesen. Verglichen mit der KCNQ2/3-Kontrolle (schwarz; Abb. 3.4 B) bewirkte die zusätzliche Überexpression der KCNQ2/3-Kanäle mit den Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten (blau) eine in zwei Datenpunkten (-80 und -70 mV) signifikante Verzögerung der Deaktivierungskinetik.

### **3.3.2 Einfluss von Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten auf homomere KCNQ2- und KCNQ3-Ströme**

Anhand der folgenden Messungen sollte quantifiziert werden, ob sich der beobachtete Effekt der humanen Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten auf die Stromparameter der heteromeren hKCNQ2/3-Kanäle auch auf die hKCNQ2- und hKCNQ3-Monomere übertragen ließe.

Abb. 3.5 A zeigt die spannungsabhängige Aktivierung der KCNQ2-Ströme. Das Potential der halbmaximalen Aktivierung  $V_{0.5}$  betrug für KCNQ2 (schwarz)  $-15.3 \pm 0.9$  mV, bei einem  $k$  von  $12.6 \pm 0.4$  mV ( $n = 10$ ). Eine Koexpression von KCNQ2 mit Na<sub>v</sub> β2 (blau) hatte mit einem  $V_{0.5}$  von  $-18.9 \pm 2.4$  mV ( $k = 11.9 \pm 0.5$  mV,  $n = 9$ ) keine wesentliche Verschiebung der Aktivierungskurve zur Folge.

Auf den Einfluss der BACE1 (rot), respektive der N- und C-terminalen Fragmente der Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten (grau bzw. grün) auf die KCNQ2-Homomere wird in Abschnitt 3.4.2 näher eingegangen.

Weder die Aktivierungs-, noch die Deaktivierungskinetiken unterschieden sich bei einer Überexpression mit den Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten von der KCNQ2-Kontrolle (Abb. 3.5 B und Tab. 6.3).

In Abb. 3.5 C betrug  $V_{0.5}$  für die Ströme des KCNQ3-Homomers (schwarz)  $-34.9 \pm 1.2$  mV ( $k = 9.7 \pm 0.57$  mV,  $n = 8$ ). Die Na<sub>v</sub> β2-Untereinheit (blau) bewirkte keine signifikante Veränderung des Verlaufes der KCNQ3-Aktivierungskurve.  $V_{0.5}$  betrug  $-32.5 \pm 1.3$  mV ( $k = 11.2 \pm 0.7$  mV,  $n = 7$ ).

Abb. 3.5 D zeigt die Aktivierungskinetiken der KCNQ3-Homomere (schwarz) mit und ohne  $\text{Na}_v \beta 2$  (blau), deren Verläufe sich nicht unterschieden. Die Deaktivierungskinetik hingegen wies eine signifikante Beschleunigung unter Kotransfektion mit den  $\beta 2$ -Untereinheiten (blau) auf (Abb. 3.5 D und Tab. 6.3).

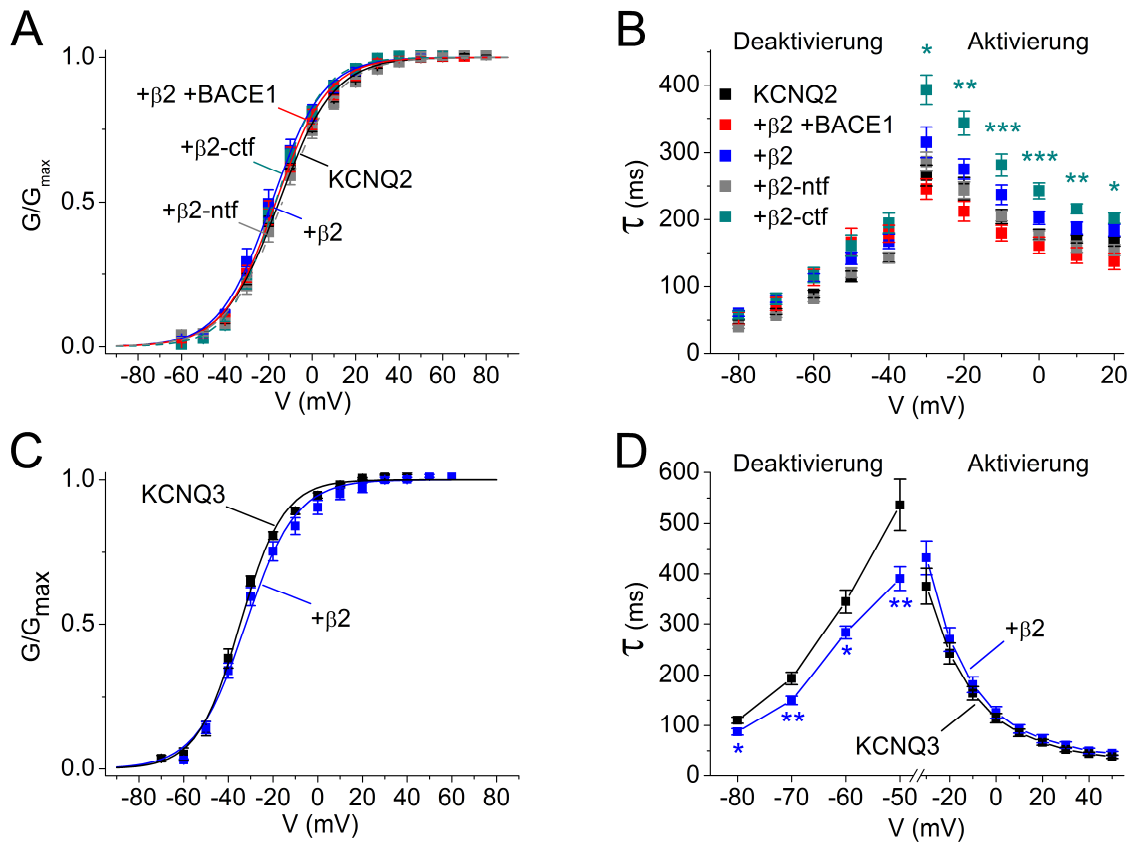


Abb. 3.5: Einfluss der  $\text{Na}_v \text{h}\beta 2$ -Untereinheit mit und ohne Überexpression der hBACE1 bzw. der  $\text{Na}_v \text{m}\beta 2$ -Fragmente auf die Aktivierungskurven und Zeitkonstanten der hKCNQ2- und hKCNQ3-Homomere. **A)** Spannungsabhängige Aktivierung des hKCNQ2-Homomers bei transienter Transfektion mit den humanen  $\text{Na}_v \beta 2$ -Untereinheiten mit und ohne hBACE1, respektive  $\text{Na}_v \text{m}\beta 2$ -ctf oder  $\text{Na}_v \text{m}\beta 2$ -ntf in HEK293-Zellen. **B)** Aktivierungs- und Deaktivierungszeitkonstanten der hKCNQ2-Ströme in Kombination mit den in A aufgeführten Expressionsvarianten. **C)** Aktivierungskurven der hKCNQ3-Monomere und deren Überexpression mit  $\text{Na}_v \text{h}\beta 2$ . Die korrespondierenden Kinetiken sind in **D)** aufgezeigt. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 3.3.3 Einfluss von Na<sub>v</sub> $\beta$ 4-Untereinheiten auf heteromere KCNQ2/3-Kanäle

Eine Überexpression der Na<sub>v</sub>  $\beta$ 4-Untereinheiten mit KCNQ2/3 (blau) hatte, abgesehen von einer leichten Linksverschiebung in Richtung Hyperpolarisation, keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivierungskurve der KCNQ2/3-Kanäle (schwarz; s. Abschnitt 3.3.1).  $V_{0.5}$  betrug hierbei  $-25.1 \pm 1.3$  mV,  $k = 10.1 \pm 0.3$  mV bei  $n = 17$  (Abb. 3.6 A). Auf die unter BACE1-Einfluss bestehende Linksverschiebung der KCNQ2/3-Aktivierungskurve (rot) wird in Abschnitt 3.4.2 näher eingegangen.

Wie in Abb. 3.6 B veranschaulicht, waren die Aktivierungszeitkonstanten unter Koexpression des KCNQ2/3-Heteromers mit den Na<sub>v</sub>  $\beta$ 4-Untereinheiten (blau) im Vergleich zur KCNQ2/3-Kontrolle (schwarz) ab Potentialen  $\geq +20$  mV beschleunigt (Tab. 6.3). Die Deaktivierungszeitkonstanten verhielten sich unter Koexpression der KCNQ2/3-Heteromere mit den Na<sub>v</sub>  $\beta$ 4-Untereinheiten nicht signifikant unterschiedlich zur KCNQ2/3-Referenz.

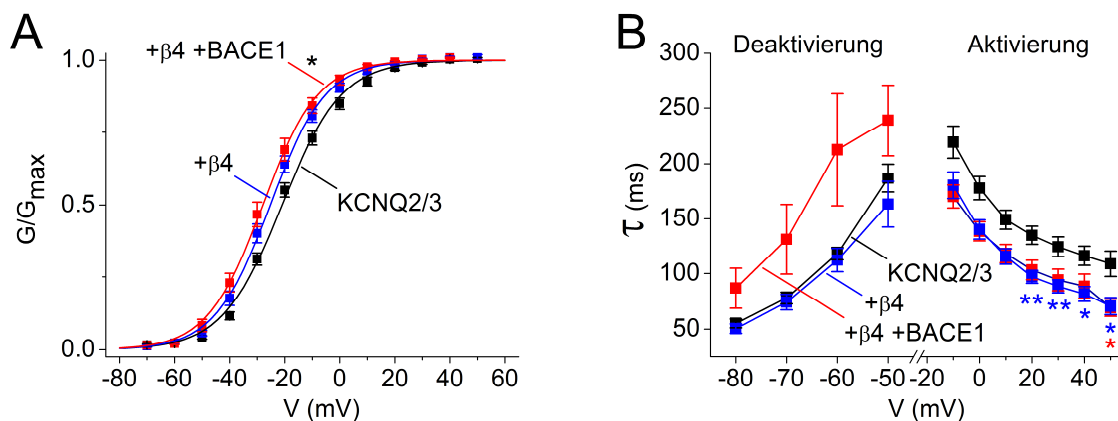


Abb. 3.6: **Einfluss der Na<sub>v</sub>  $\beta$ 4-Untereinheit auf die Aktivierungskurven und Zeitkonstanten der hKCNQ2/3-Heteromere mit und ohne Überexpression der hBACE1.** **A)** Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von hKCNQ2/3-Kanälen mit und ohne transienter Überexpression der murinen Na<sub>v</sub>  $\beta$ 4-Untereinheit in HEK293-Zellen. Die Aktivierungskurven wurden aus Messungen wie in Abb. 3.3 D erstellt und mit einem Boltzmann-Fit angepasst. **B)** Zeitkonstanten der Aktivierung und Deaktivierung von hKCNQ2/3, respektive bei deren Überexpression mit den Na<sub>v</sub>  $\beta$ 4-Untereinheiten mit und ohne hBACE1-Überexpression. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



### **3.4 BACE1 beeinflusst die Interaktionen zwischen KCNQ2- und KCNQ3-Kanälen mit Na<sub>v</sub> β2- und β4-Untereinheiten in HEK293-Zellen**

In der Literatur gibt es Hinweise, sowohl erhöhte BACE1-Dichten, als auch deren erhöhte Aktivität seien mit der Alzheimer'schen Demenz assoziiert (Yang et al., 2003; Li et al., 2004).

Im Folgenden sollte daher im Expressionssystem ein möglicher Einfluss einer BACE1-Überexpression auf die den neuronalen M-Strom ( $I_M$ ) hauptsächlich generierenden KCNQ2- und KCNQ3-Kaliumkanäle (Kv7.2 und Kv7.3; Wang et al., 1998; Shapiro et al., 2000) untersucht werden. Der M-Strom nimmt insofern eine Sonderstellung hinsichtlich der neuronalen Exzitabilität ein, als er einer der Kaliumströme ist, die im Spannungsbereich der Initiierung von Aktionspotentialen aktiv sein können (Marrion, 1997; Rivera-Arconada et al., 2009). In diesem Kontext stellt er auch einen entscheidenden limitierenden Faktor für das repetitive Feuern von Neuronen dar, da schon dezente Veränderungen dieser im kritischen Potentialbereich regulierten Größe eine Erhöhung der Membranexzitabilität zur Folge haben können.

Eine mögliche Modulation des M-Stroms durch BACE1 könnte daher neben den derzeit in der Literatur diskutierten Natriumkanälen (Kim et al., 2007) ein weiteres elektrophysiologisches Korrelat für die erhöhte Inzidenz der Epilepsie bei Alzheimerpatienten (Amatniek et al., 2006) darstellen. In diesem Kontext beschreiben Kearney et al. (2006) den interessanten Befund, dass die Individuen mit den für das Auftreten der dort untersuchten Epilepsieform verantwortlichen Na<sub>v</sub>1.2-Kanalmutationen durch zusätzliche Mutationen von KCNQ2-Kanälen phänotypisch eine verstärkte, additive Epilepsie-Symptomatik aufwiesen.

Im Folgenden wurden die humanen KCNQ2- und KCNQ3-Konstrukte in verschiedenen Kombinationen mit der hBACE1 und den Na<sub>v</sub>-Untereinheiten hβ2, mβ2-ctf, mβ2-ntf und mβ4 transient in HEK293-Zellen transfiziert und deren Ströme mit Hilfe von Whole-Cell Messungen analysiert.

### 3.4.1 BACE1-Effekte auf die Stromparameter heteromerer KCNQ2/3-Kanäle unter Einfluss von Na<sub>v</sub> β2 und β4

Die alleinige Überexpression mit BACE1 (violett) in Abb. 3.7 A diene als Kontrolle, um einen möglichen Eigeneffekt von BACE1 auf die KCNQ2/3 α-Untereinheiten (schwarz) auszuschließen. Die halbmaximale Aktivierung  $V_{0.5}$  wies bei zusätzlicher Überexpression mit BACE1 keine signifikante Verschiebung der Aktivierungskurve auf.  $V_{0.5}$  betrug für KCNQ2/3 in Anwesenheit von BACE1  $-25.2 \pm 2.0$  mV ( $k = 9.9 \pm 0.2$  mV,  $n = 13$ ).

Die in Abb. 3.7 B dargestellten Aktivierungszeitkonstanten der nativen KCNQ2/3-Ströme wiesen unter Koexpression mit BACE1 ab einem Potential  $\geq +20$  mV eine signifikante Beschleunigung auf (s. Abschnitt 3.3.1). Deren Deaktivierungskinetiken unterschieden sich nicht voneinander (Abb. 3.7 B und Tab. 6.3).

Die unter Koexpression der KCNQ2/3-Kanäle mit den Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten (Abb. 3.4 A; blau) zu beobachtende Linksverschiebung der Aktivierungskurve (Abb. 3.4 A; schwarz; s. Abschnitt 3.3.1) wies unter zusätzlicher Überexpression von BACE1 (Abb. 3.4 A; rot) wieder einen in Richtung Depolarisation verschobenen, an die KCNQ2/3-Kontrollkurve zurückverlagerten Verlauf auf.  $V_{0.5}$  betrug  $-19.2 \pm 1.9$  mV ( $k = 9.8 \pm 0.5$  mV,  $n = 10$ ).

Während die Aktivierungszeitkonstanten der KCNQ2/3-Kanäle (schwarz) unter Kotransfektion der Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten (blau) keine Unterschiede aufwiesen (s. Abb. 3.4 B, zeigte sich in der gleichen Abbildung unter einer zusätzlichen Überexpression mit BACE1 (rot) ab Potentialen  $\geq +20$  mV eine signifikante Beschleunigung der Aktivierung. Eine Überexpression der KCNQ2/3-Heteromere (schwarz) mit den Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten (blau) verursachte eine in zwei Datenpunkten ( $-70$  und  $-80$  mV) signifikante Verzögerung der Deaktivierungszeitkonstanten (Abb. 3.7 B). Dieser Effekt ließ sich durch eine zusätzliche Koexpression mit BACE1 (rot) wieder aufheben.

Unter Präinkubation der HEK293-Zellen mit dem BACE1-Inhibitor C3 (grün; Abb. 3.7 C) ließ sich die oben beschriebene Rückverlagerung der durch das KCNQ2/3+Na<sub>v</sub> β2-Konstrukt in Richtung Hyperpolarisation verschobenen KCNQ2/3-

Aktivierungskurve unter zusätzlicher BACE1-Überexpression durch deren Inhibition wieder aufheben ( $p = 0.007$ ). Somit ließ sich demnach der BACE1-Effekt auf das KCNQ2/3+Na<sub>v</sub>  $\beta$ 2-Konstrukt durch die Kontrolle mit dem BACE1-Inhibitor C3 wieder aufheben.  $V_{0.5}$  betrug  $-28.2 \pm 1.1$  mV ( $k = 10.5 \pm 0.4$  mV,  $n = 16$ ).

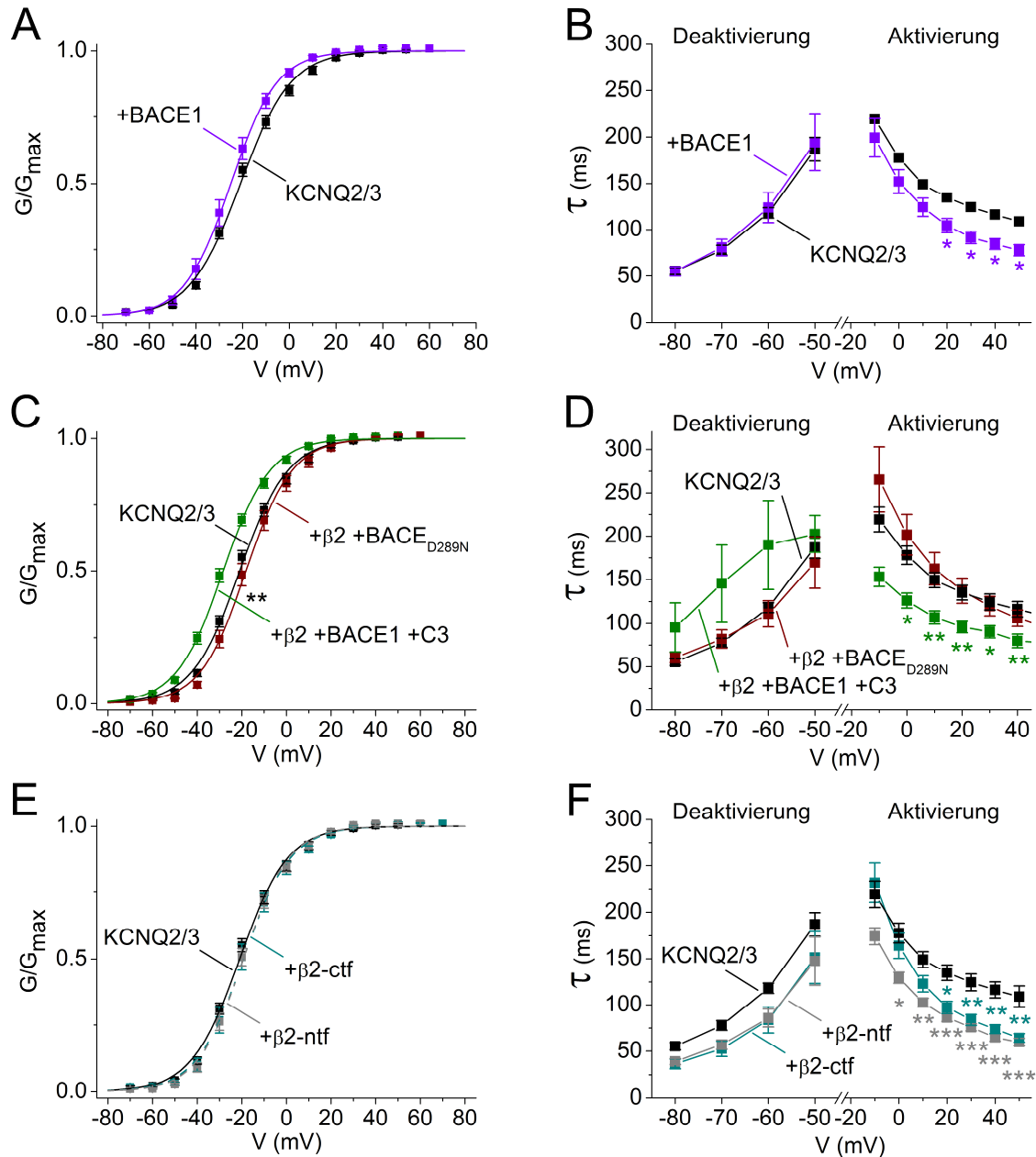


Abb. 3.7: Einfluss der Na<sub>v</sub> hβ2-Untereinheiten auf hKCNQ2/3-Ströme und deren Modulation durch hBACE1. In A), C) und E) sind die Aktivierungskurven der hKCNQ2/3-Homomere bei transienter Transfektion mit A) hBACE1 oder C) unter Koexpression mit den humanen Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten und der inaktiven (murinen), oder der durch C3 inaktivierten (humanen) BACE1, respektive E) den murinen C- und N-terminalen Fragmenten der Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten in HEK293-Zellen. B), D) und F) zeigt die entsprechenden Aktivierungs- und Deaktivierungszeitkonstanten. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Die unter Überexpression der KCNQ2/3-Heteromere (schwarz) und den Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten (blau) mit der BACE1 (rot) erfolgte Beschleunigung der Aktivierungszeitkonstanten (Abb. 3.4 B) konnte durch Inhibition der BACE1 mit C3 (grün; Abb. 3.7 D) nicht aufgehoben werden. Auch hier war über die Potentialspanne von 0 mV bis +40 mV eine gegenüber der Kontrolle (schwarz) signifikant beschleunigte Kinetik zu verzeichnen.

Anhand der Abb. 3.7 D wird deutlich, dass sich die ursprünglich durch die Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten vermittelte Verzögerung der Deaktivierungszeitkonstanten (blau; Abb. 3.4 B) mittels Inhibition der BACE1 durch C3 (grün) zumindest tendenziell wieder erreichen ließ. Dabei hob C3 die durch BACE1 vermittelte Verzögerung der Deaktivierung von KCNQ2/3-Na<sub>v</sub> β2 (blau; Abb. 3.4 B) tendenziell wieder auf.

Die C- und N-terminalen Fragmente der Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten (β2-ctf; blau und β2-ntf; grau in Abb. 3.7 E), die als Kontrolle einer durch die BACE1 erfolgten Prozessierung der Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten koexprimiert wurden, zeigten keinen Einfluss auf den Verlauf der Aktivierungskurve der KCNQ2/3-Heteromere (β2-ctf:  $V_{0.5} = -19.2 \pm 2.0$  mV,  $k = 10.4 \pm 0.4$  mV,  $n = 14$ ; β2-ntf:  $V_{0.5} = -19.3 \pm 1.4$  mV,  $k = 10.1 \pm 0.5$  mV,  $n = 16$ ). Sie stellen ein weiteres Indiz dafür dar, dass es einer vollständigen, nicht durch BACE1 geschnittenen Na<sub>v</sub> β2-Untereinheit bedarf, um eine Linksverschiebung der KCNQ2/3-Aktivierungskurve zu bewirken.

Die C- und N-terminalen Na<sub>v</sub> β2-Fragmente β2-ntf (grau) und β2-ctf (blau) bewirkten beide eine signifikante Beschleunigung der Aktivierungszeitkonstanten (Abb. 3.7 F), wobei sich hinsichtlich der Deaktivierungskinetiken keine zur Kontrolle signifikanten Unterschiede zeigten.

Als Kontrolle einer möglicherweise vorhandenen enzymatischen Wirkkomponente der BACE1 auf die Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten an der Rückverschiebung der KCNQ2/3-Aktivierungskurve wurde das katalytisch inaktive, murine BACE1-Konstrukt mBACE1<sub>D289N</sub> verwendet. Bei der mittels PCR-Mutagenese gewonnenen BACE1<sub>D289N</sub>-Mutante war innerhalb der zweiten katalytisch aktiven Bindungsstelle (s. Abschnitt 1.3.1.2 und Abb. 1.4) an Position 289 die Aminosäure Asparaginsäure (Asp, D) gegen Asparagin (Asn, N) ausgetauscht worden (Asp289 → Asn [D289 →

N]). Dies sollte eine Inaktivierung der  $\beta$ -Sekretaseaktivität bewirken (Huse et al., 2003). Wurde BACE1<sub>D289N</sub> mit KCNQ2/3  $\alpha$ - und Na<sub>v</sub>  $\beta$ 2-Untereinheiten koexprimiert, so zeigte sich, bezogen auf die KCNQ2/3-Aktivierung, keine signifikante Verschiebung (braun; Abb. 3.7 C).  $V_{0.5}$  betrug  $-17.9 \pm 1.8$  mV mit einem  $k = 10.1 \pm 0.5$  mV, bei  $n = 10$ . Die inaktive BACE1 hätte in Analogie zu den vorherigen Resultaten den Effekt der Na<sub>v</sub>  $\beta$ 2-Untereinheiten auf den Verlauf der KCNQ2/3-Aktivierungskurve (blau; Abb. 3.4 A) nicht beeinflussen dürfen. Dies lässt im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen einen von der Sekretaseaktivität der BACE1 unabhängigen Einfluss auf die miteinander interagierenden KCNQ2/3- und Na<sub>v</sub>  $\beta$ 2-Untereinheiten vermuten. Alternativ könnte es sich bei der verwendeten BACE1<sub>D289N</sub>- Mutante auch um eine nicht funktionale, in diesem Fall weiterhin aktive BACE1 handeln.

Unter Koexpression mit den Na<sub>v</sub>  $\beta$ 2-Untereinheiten zeigte die inaktive BACE<sub>D289N</sub> (braun) keine zu den Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken der KCNQ2/3-Kontrolle (schwarz) unterschiedlichen Verläufe (Abb. 3.7 D).

Die unter transienter Überexpression der KCNQ2/3-Kanäle mit den Na<sub>v</sub>  $\beta$ 4-Untereinheiten beobachtete tendenzielle Verschiebung der Aktivierungskurve in Richtung Hyperpolarisation (blau; Abb. 3.6 A) wurde bei zusätzlicher Überexpression mit hBACE1 (rot) signifikant ( $p = 0.028$ ) und war bei halbmaximaler Aktivierung gegenüber der KCNQ2/3-Kontrolle um 7.3 mV in Richtung Hyperpolarisation verschoben (s. Abschnitt 3.3.3 und Abb. 3.6).  $V_{0.5}$  betrug  $-28.0 \pm 1.8$  mV, bei einem  $k$  von  $10.0 \pm 0.3$  mV und  $n = 12$  Messungen.

Die bei Koexpression der KCNQ2/3-Heteromere (schwarz) mit den Na<sub>v</sub>  $\beta$ 4-Untereinheiten und der BACE1 (rot; Abb. 3.6 B) vorhandene tendenzielle Beschleunigung der Aktivierungskinetik erreichte lediglich in einem Datenpunkt (50 mV) ein signifikantes Niveau. Eine Koexpression der KCNQ2/3-Heteromere mit den Na<sub>v</sub>  $\beta$ 4-Untereinheiten und der BACE1 (rot) hatte, außer der angedeuteten Tendenz einer verzögerten Deaktivierungskinetik, keinen signifikant unterschiedlichen Verlauf zur KCNQ2/3-Kontrolle oder deren Kotransfektion mit den Na<sub>v</sub>  $\beta$ 4-Untereinheiten.

Die Slopefaktoren verhielten sich in dieser Messreihe mit den KCNQ2/3-Heteromeren alle annähernd identisch (Tab. 6.2), was die Auswahlgüte und Vergleichbarkeit der Daten unterstreicht.

### **3.4.2 BACE1-Effekte auf die Stromparameter homomerer KCNQ2-Kanäle unter Einfluss von $\text{Na}_v \beta 2$**

Abb. 3.5 A zeigt die spannungsabhängige Aktivierung der KCNQ2-Homomere (zum Vergleich s. Abschnitt 3.3.2). Keine der im Folgenden gemachten Koexpressions-experimente zeigte einen zur KCNQ2-Kontrolle (schwarz) unterschiedlichen Verlauf der Aktivierungskurven. Bei einer zusätzlichen Überexpression des KCNQ2+ $\text{Na}_v \beta 2$ -Konstruktes (blau) mit BACE1 (rot) betrug das halbmaximale Aktivierungspotential  $V_{0.5} = -16.4 \pm 2.1 \text{ mV}$  ( $k = 11.9 \pm 0.4 \text{ mV}$ ,  $n = 7$ ). Eine Koexpression des KCNQ2-Homomers mit der geschnittenen Untereinheit  $\text{Na}_v \beta 2$ -ntf (grau) hatte ein  $V_{0.5}$  von  $-13.6 \pm 1.8 \text{ mV}$  ( $k = 12.8 \pm 0.4 \text{ mV}$ ,  $n = 11$ ) zur Folge, bei dem Konstrukt KCNQ2+  $\text{Na}_v \beta 2$ -ctf (blau) betrug  $V_{0.5} = -16.8 \pm 1.1 \text{ mV}$  ( $k = 10.7 \pm 0.4 \text{ mV}$ ,  $n = 9$ ).

Anhand der Abb. 3.5 B ist ersichtlich, dass weder eine Überexpression der KCNQ2-Homomere (schwarz) mit den  $\text{Na}_v \beta 2$ -Untereinheiten (blau) bzw. deren Koexpression mit der BACE1 (rot), noch die Überexpression mit den N-terminalen  $\text{Na}_v \beta$  – Untereinheiten (grau) einen Effekt auf die Aktivierungszeitkonstanten hatten. Eine Koexpression des KCNQ2-Homomers mit  $\text{Na}_v \beta 2$ -ctf (blau) hingegen zeigte, verglichen mit der KCNQ2-Kontrolle (schwarz), eine über den Verlauf von  $-30 \text{ mV}$  bis  $+20 \text{ mV}$  signifikant verzögerte Aktivierungskinetik.

Alle in Abb. 3.5 B dargestellten Deaktivierungskinetiken unterschieden sich nicht von denen der KCNQ2-Homomere (schwarz; s. Abschnitt 3.3.2).

### 3.5 BACE1-Effekte auf die Stromparameter heteromerer KCNQ2/3-Kanäle unter Einfluss von $\text{Na}_v \beta 2$ in N1E-115 Zellen

Die im Expressionssystem beobachtete Modulation der heteromeren KCNQ2/3-Ströme durch die  $\text{Na}_v \beta 2$ -Untereinheiten und deren Beeinflussung unter Überexpression mit der BACE1 wurden im Folgenden anhand von Messungen in murinen Neuroblastomzellen überprüft. Die entsprechende cDNA wurde transient in Zellen der Neuroblastomzelllinie N1E-115 transfiziert. Wie im Diskussionsteil näher beschrieben, kann durch Ergebnisse einer RT-PCR (Huth et al., 2009) davon ausgegangen werden, dass die verwendeten N1E-Zellen intrinsisch signifikante Level der BACE1 exprimieren. Ein Vorkommen der  $\text{Na}_v \beta 2$ -Untereinheiten kann für die verwendete Zelllinie mit der gleichen Methode relativ sicher ausgeschlossen werden. Die intrinsische BACE1 wurde in den folgenden Experimenten durch Compound 3 (C3) inhibiert.

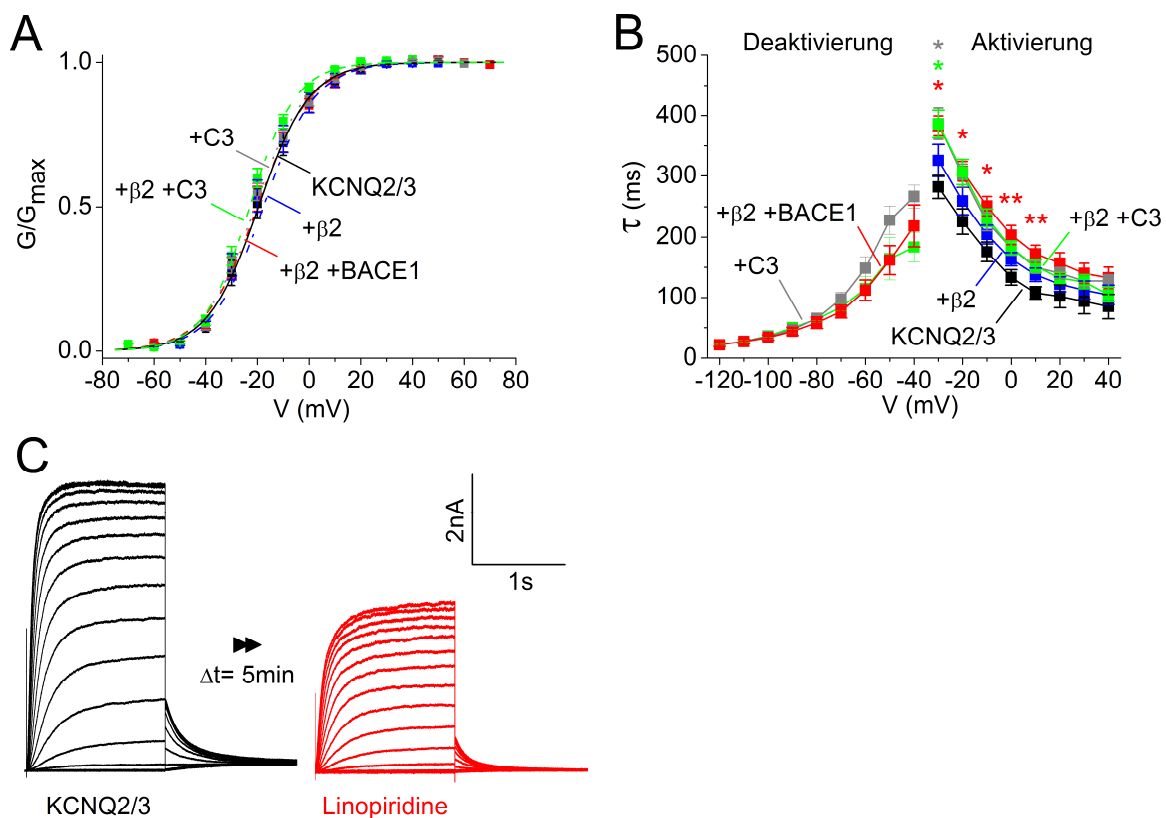


Abb. 3.8: Einfluss der humanen  $\text{Na}_v \beta 2$ -Untereinheit auf humane KCNQ2/3-Ströme und deren Modulation durch BACE1 in N1E-Zellen. **A)** Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von hKCNQ2/3-Kanälen mit und ohne transienter Überexpression der  $\text{Na}_v \beta 2$ -Untereinheiten oder der hBACE1 mit und ohne deren Inhibition durch C3, respektive der Inhibition der intrinsischen BACE1 durch C3. Die Aktivierungskurven wurden aus Messungen wie in C erstellt und mit einem Boltzmann-Fit angepasst. **B)** Aktivierungs- und Deaktivierungszeitkonstanten der entsprechenden hKCNQ2/3-Konstrukte. **C)** Im gleichen Maßstab dargestellte Kontrollmessung mit dem KCNQ2/3-selektiven Inhibitor Linopiridine. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Keine der in Abb. 3.8 A abgebildeten Aktivierungskurven wies einen signifikant unterschiedlichen Verlauf zu der KCNQ2/3+C3-Referenzkurve (grau;  $V_{0.5} = -24.3 \pm 1.2$  mV ( $k = 9.0 \pm 0.2$  mV,  $n = 8$ )) auf. Wie schon im HEK293-System beobachtet, glichen die Slopefaktoren einander auch in den N1E-Zellen. Unter alleiniger Überexpression des KCNQ2/3-Konstrukts betrug  $V_{0.5} = -20.4 \pm 2.5$  mV (schwarz;  $k = 8.9 \pm 0.2$  mV,  $n = 3$ ). Unter Kotransfektion von KCNQ2/3 mit den  $\text{Na}_v \beta 2$ -Untereinheiten mit und ohne vorheriger C3-Präinkubation war ebenfalls kein unterschiedlicher Aktivierungsverlauf nachweisbar (KCNQ2/3+ $\beta 2$ :  $V_{0.5} = -18.8 \pm 1.4$  mV,  $k = 8.2 \pm 0.2$  mV,  $n = 2$ , blau vs. grün, KCNQ2/3+ $\beta 2$ +C3:  $V_{0.5} = -25.2 \pm 1.4$  mV,  $k = 8.3 \pm 0.3$  mV,  $n = 6$ ).  $V_{0.5}$  bei Überexpression mit KCNQ2/3,  $\text{Na}_v \beta 2$  und BACE1 (rot) betrug  $-21.0 \pm 1.4$  mV bei einem  $k = 9.4 \pm 0.3$  mV ( $n = 8$ ).

In Abb. 3.8 B werden die verschiedenen Aktivierungskinetiken verglichen (s. Tab. 6.3). Die Koexpression von KCNQ2/3 mit  $\text{Na}_v \beta 2$  unter Inhibition der intrinsischen BACE1 durch C3 (grün) zeigte keinen wesentlichen Unterschied zur Aktivierungskinetik der KCNQ2/3+C3-Referenz (grau). Auch unterschieden sich die Aktivierungszeitkonstanten bei Überexpression der N1E-Zellen mit KCNQ2/3 (schwarz) oder deren Kotransfektion mit den  $\text{Na}_v \beta 2$ -Untereinheiten (blau) nicht von der Kontrolle.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen im HEK293-Zellsystem, bei dem die Aktivierungszeitkonstanten im Vergleich zur Kontrolle beschleunigt waren (s. Abschnitt 3.4.1 und Abb. 3.4), zeigte sich in N1E-Zellen bei Koexpression der KCNQ2/3-Heteromere mit den  $\text{Na}_v \beta 2$ -Untereinheiten und der BACE1 (rot) eine über die Potentialspanne von -30 bis +10 mV signifikant verzögerte Aktivierungskinetik. Die Deaktivierungszeitkonstanten der KCNQ2/3-Heteromere unter gleichzeitiger Inhibition der intrinsischen BACE1 durch C3 (grau) sind in Abb. 3.8 B dargestellt. Eine zusätzliche Überexpression mit den  $\text{Na}_v \beta 2$ -Untereinheiten (grün) übte keinen Effekt auf die Deaktivierungskinetiken aus; Gleiches gilt für das KCNQ2/3+BACE1+ $\text{Na}_v \beta 2$ -Konstrukt (rot).

Folglich lassen sich die in N1E-Zellen erhobenen Befunde nicht mit den in HEK293 gemessenen Ergebnissen in einen funktionalen Zusammenhang bringen.



In Abb. 3.8 C ist ein typischer Originalstromverlauf der KCNQ2/3-Kanäle bei transienter Expression in N1E-115 Zellen während der Aktivierung aufgezeigt. Durch Applikation von 10  $\mu\text{M}$  des selektiven KCNQ2/3-Inhibitors Linopiridine ließ sich die Stromamplitude deutlich reduzieren (rot). Zur Inhibition der TTX-sensitiven Fraktion der in N1E-Zellen intrinsisch exprimierten Natriumkanäle wurde 1  $\mu\text{M}$  Tetrodotoxin in die Badlösung appliziert.

### 3.6 Effekt von BACE1 auf den kardialen $I_{Ks}$ -Strom in HEK293-Zellen

In Analogie zu den neuronalen KCNQ2/3-Kanälen und deren möglicherweise vorhandene Beeinflussung durch die ubiquitär vorkommende  $\beta$ -Sekretase, stellt sich die Frage nach weiteren Substraten der BACE1 innerhalb dieser Kanalfamilie.

Im Expressionssystem stellen KCNQ1/E1-Kanäle mit ihren langsam aktivierenden, einwärtsgerichteten Kaliumströmen das Korrelat für den kardialen  $I_{Ks}$ -Strom dar, welcher für die späte Repolarisationsphase des Aktionspotentials kardialer Myozyten verantwortlich ist (Salata et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996; Cordeiro et al., 1998). Rossner et al. (2001) konnten die Präsenz von BACE1 in murinem Herzgewebe nachweisen.

In der folgenden Versuchsreihe ging es um die Fragestellung, ob die Überexpression mit BACE1 und eine möglicherweise hiermit einhergehende enzymatische Spaltung von KCNE1  $\beta$ -Untereinheiten (D. Y. Kim; personal communication; s. Abschnitt 4.6) einen Einfluss auf  $I_{Ks}$ -Ströme haben könnte. Hierzu wurden die humanen KCNQ1/E1-Konstrukte mit und ohne Überexpression der humanen BACE1 transient in HEK293-Zellen transfiziert und mit Hilfe von Whole-Cell Messungen untersucht. Eine alleinige Untersuchung der KCNQ1  $\alpha$ -Untereinheiten als Homomere erwies sich in dem verwendeten HEK293-Expressionsmodell aufgrund der sehr niedrigen Stromamplitude als nicht zufriedenstellend möglich.

#### 3.6.1 BACE1 bewirkt eine Rechtsverschiebung der KCNQ1/E1-Aktivierung

Abb. 3.9 A zeigt den für die KCNQ1/E1-Heteromere charakteristischen Verlauf einer sehr langsamen Aktivierung, welche auch nach 5 s noch kein Gleichgewicht (Steady-State) erreicht. Wie im Abschnitt 2.7 beschrieben, wurden aus diesen Experimenten Aktivierungskurven konstruiert (Abb. 3.9 F sowie Abb. 3.3 E und F). Das Umkehrpotential  $E_{rev}$  zur Ermittlung der Leitfähigkeit  $G$  betrug laut Nernst'scher Gleichung für KCNQ1/E1 = -87.2 mV.

Die halbmaximale Aktivierung  $V_{0.5}$  wies bei zusätzlicher Überexpression mit BACE1 (rot) eine signifikante Rechtsverschiebung ( $p = 0.02$ ) in Richtung Depolarisation auf.

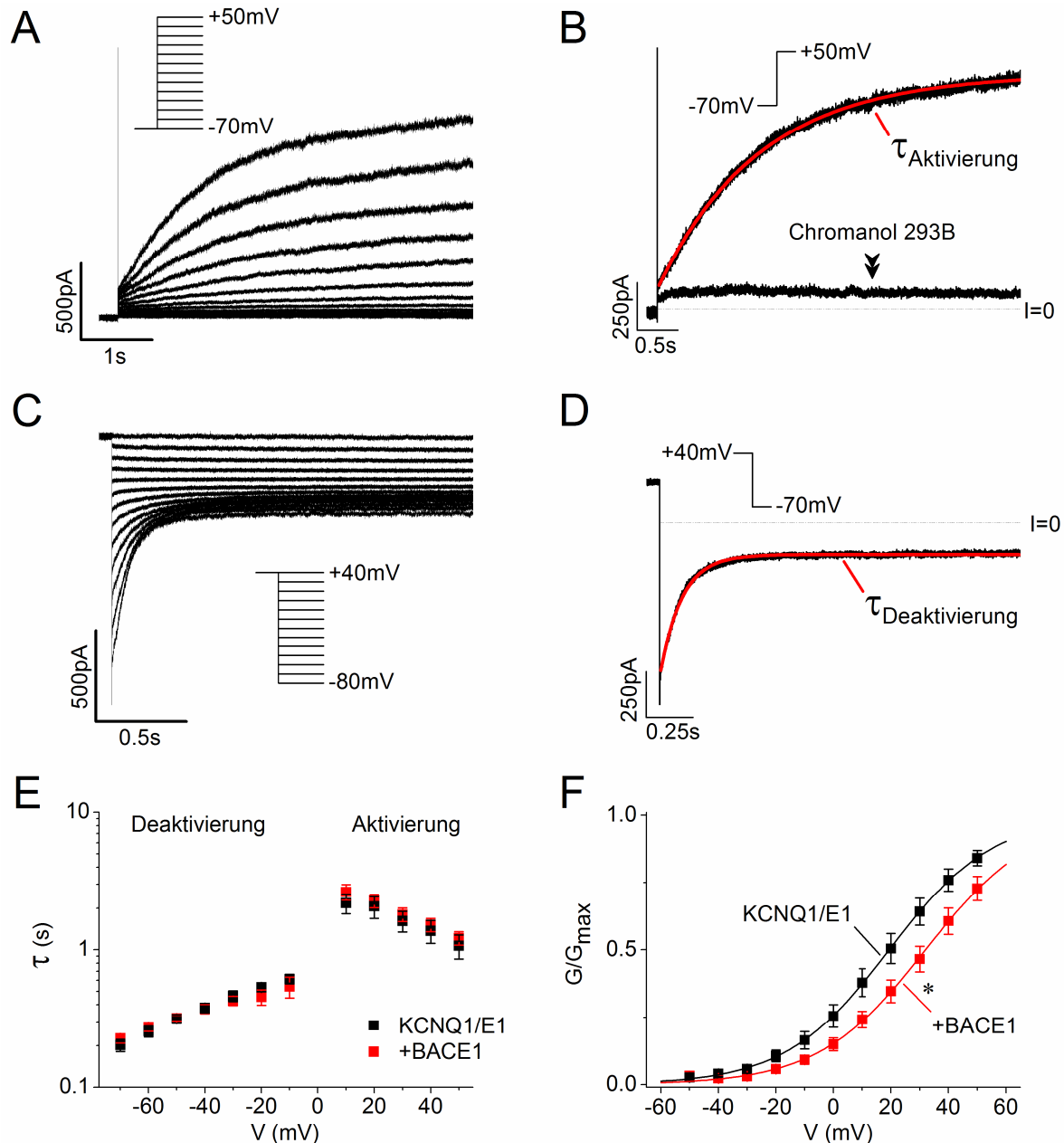


Abb. 3.9: **Effekt von hBACE1 auf hKCNQ1/E1 Ströme.** Whole-Cell Ableitungen von hKCNQ1/E1-Strömen in transient transfizierten HEK293-Zellen mit und ohne Überexpression von hBACE1. **A)** Typische Aktivierung von hKCNQ1/E1-Strömen bei schrittweiser Depolarisierung (kotransfiziert mit hBACE1). Der Vorpuls bei -70 mV und die variablen Depolarisationsschritte betrugen 5 s. **B)** Monoexponentieller Fit (rot) einer Originalstromspur (schwarz) zur Ermittlung der Aktivierungszeitkonstanten. Zusätzlich dargestellt wurde die Kontrolle mit dem spezifischen  $I_{\text{Ks}}$ -Inhibitor Chromanol 293B (100  $\mu\text{M}$ ). **C)** Tail-Ströme bei hoher externer Kaliumkonzentration wurden anhand des abgebildeten Spannungsprotokolles (Inset) gemessen. Der Vorpuls wurde bei +40 mV für 1 s angelegt, gefolgt von 2 s dauernden Depolarisationen. **D)** Die Tail-Ströme zur Ermittlung der Deaktivierungskinetik wurden mit einem monoexponentiellen Fit angepasst. **E)** Spannungsabhängige Zeitkonstanten der Aktivierung und Deaktivierung von hKCNQ1/E1, respektive bei einer Überexpression mit hBACE1. **F)** Spannungsabhängigkeit der Aktivierung mit und ohne hBACE1-Überexpression. Die Aktivierungskurven wurden aus Messungen wie in A erstellt und mit einem Boltzmann-Fit angepasst. In Anwesenheit von hBACE1 (rot) zeigte sich eine signifikante Rechtsverschiebung des Potentials für die halbmaximale Aktivierung  $V_{0.5}$  in Richtung depolarisierterer Potentiale. \* $p < 0.05$ .

$V_{0.5}$  betrug hierbei für KCNQ1/E1  $20.4 \pm 3.7$  mV ( $k = 18.2 \pm 0.3$  mV,  $n = 10$ ), in Anwesenheit von BACE1  $32.7 \pm 3.3$  mV ( $k = 19.1 \pm 0.8$  mV,  $n = 13$ ). Eine Überexpression von BACE1 hatte, im Vergleich zum alleinigen KCNQ1/E1-Konstrukt, keinen Unterschied hinsichtlich des Slopefaktors zur Folge.  $V_{0.5}$ , die Slopefaktoren und die unten aufgeführten Kinetiken gehen in etwa mit Literaturdaten von humanen KCNQ1/E1-Konstrukten im HEK293-System konform (Sun et al., 2008).

Tab.3.2: **Aktivierungsparameter und Stromdichten von hKCNQ1/E1.** Dargestellt jeweils als Mittelwert  $\pm$  S.E.M.

Konstrukt	Aktivierung				Stromdichte bei +40 mV	
	$V_{0.5}$ (mV)	Slope (mV)	n	p	(pA/pF)	p
<i>hKCNQ1/E1</i>	$20.4 \pm 3.7$ mV	$18.2 \pm 0.3$ mV	10	--	$46.7 \pm 9.7$	--
<i>+hBACE1</i>	$32.7 \pm 3.3$ mV	$19.1 \pm 0.8$ mV	13	0.022	$49.7 \pm 7.8$	0.8

### 3.6.2 BACE1 hat keinen Einfluss auf die Zeitkonstanten der KCNQ1/E1-Ströme

Ein weiterer essentieller Parameter zur elektrophysiologischen Charakterisierung des KCNQ1-Kanals, insbesondere bei dessen Kombination mit KCNE1, stellt die Kinetik der Aktivierung und der Deaktivierung während einer induzierten Änderung des Membranpotentials dar. Mittels eines monoexponentiellen Fits ließen sich die spannungsabhängigen Kinetiken der Aktivierung (Abb. 3.9 B) aus den in Abb. 3.9 A gezeigten Stromverläufen ermitteln. Um die in Abb. 3.9 C dargestellten Deaktivierungsströme zu erhalten, wurden die transfizierten Zellen mit dem im Inset gezeigten Protokoll geklemmt. Um eine möglichst große Amplitude des Kaliumstroms bei negativen Potentialen zu generieren, wurde die externe physiologische Lösung durch eine mit erhöhter Kaliumkonzentration (Tab. 2.3;  $E_{rev} = +5.7$  mV) ersetzt. Die Bestimmung der Deaktivierungszeitkonstanten erfolgte mit Hilfe eines monoexponentiellen Fits (Abb. 3.9 D). Abb. 3.9 E zeigt die spannungsabhängigen Kinetiken von KCNQ1/E1 allein ( $n_{act.} = 6$ ,  $n_{deact.} = 11$ ) beziehungsweise bei Überexpression mit BACE1 ( $n_{act.} = 9$ ,  $n_{deact.} = 11$ ). Es zeigten sich keine signifikanten Differenzen. Die Wirkung des spezifischen KCNQ1/E1-Inhibitors Chromanol 293B (Loussouarn et al., 1997) diente in dieser Testreihe als Positivkontrolle der erfolgreichen Transfektion mit KCNQ1/E1. Abgesehen von den intrinsischen Auswärtsströmen der HEK293-Zellen ließ sich der KCNQ1/E1-Strom

bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Chromanol 293B nahezu komplett inhibieren (Abb. 3.9 B).

### **3.6.3 BACE1 hat keinen Einfluss auf die Stromdichten der KCNQ1/E1-Kanäle**

Die Erfassung eines möglichen Einflusses der BACE1 auf die Stromdichten von KCNQ1/E1 stellt einen weiteren interessanten Parameter dar. Durch ihn lassen sich Änderung der Oberflächenexpression von Kanälen beurteilen. Die Stromdichte errechnete sich aus dem Quotienten der maximalen Amplitude bei einer Depolarisation auf +40 mV und der jeweiligen Zellkapazität (KCNQ1/E1:  $n=10$ ; +BACE1:  $n=13$ ). Durch die Zugabe von BACE1 zeigte sich anhand der Daten keine signifikante Änderung der Stromdichten von KCNQ1/E1 (Tab. 3.2). Die Werte betrugen für KCNQ1/E1  $46.7 \pm 9.7$  pA/pF, für KCNQ1/E1+hBACE1  $49.7 \pm 7.8$  pA/pF. Grundsätzlich ist die Aussagekraft der hier im transienten Expressionssystem gemessenen Stromdichten limitiert, da im Gegensatz zum stabilen System keine homogenen Expressionslevel vorlagen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Die Natriumkanalaktivierung und deren Erholung von der Inaktivierung wird durch BACE1 moduliert

Die Überexpression von BACE1 in N1E-115 Neuroblastomzellen führte zu einer Linksverschiebung der Aktivierungskurve endogener Natriumströme (Abschnitt 3.1.1). Die zusätzliche pharmakologische Inhibition der BACE1 durch C3 verschob die Aktivierungskurve noch weiter in Richtung Hyperpolarisation. Eine Inhibition der endogenen BACE1 durch C3 führte ebenfalls zu einer Linksverschiebung der Aktivierungskurve (Abb.3.1 B).

Ein Eigeneffekt der C3 auf die Aktivierung von Natriumkanälen kann zumindest an  $\text{Na}_v1.2$ -überexprimierenden HEK293-Zellen ausgeschlossen werden (Huth et al., 2009). Die in dieser Arbeit verwendeten N1E-Zellen weisen ebenfalls überwiegend eine  $\text{Na}_v1.2$ -Expression auf (Benziger et al., 1999).

Diese Experimente zeigen, dass die BACE1, unabhängig von ihrer katalytischen Aktivität, zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve in Richtung Hyperpolarisation führt. Dies lässt sich durch eine direkte Interaktion der BACE1 mit den  $\text{Na}_v$   $\alpha$ -Untereinheiten erklären. Huth et al. (2009) stellten die gleiche Hypothese anhand von Versuchen mit einer katalytisch inaktiven BACE1-Mutante auf.

Die rein katalytische BACE1-Aktivität führt im Gegensatz dazu zu einer Rechtsverschiebung der Aktivierung. Diese Aktivität ergibt sich aus der Differenz der inhibierten und nicht-inhibierten BACE1-Kurven (endogene BACE1 vs. C3; überexprimierte BACE1 vs. BACE1+C3; Abb. 3.1 B). Die proteolytischen Effekte von BACE1 auf andere mögliche Targets, insbesondere die  $\beta$ -Untereinheiten von Natriumkanälen, wurden hier nicht weiter untersucht. Aus der Literatur ergeben sich die im Folgenden aufgeführten Befunde.

Huth et al. (2009) konnten zeigen, dass lediglich  $\text{Na}_v$   $\beta 1$ - und  $\beta 3$ -Untereinheiten in N1E-Zellen exprimiert werden, jedoch nicht  $\text{Na}_v$   $\beta 2$  und  $\beta 4$ . Die  $\beta 1$ - und  $\beta 3$ -Untereinheiten der Natriumkanäle stellen laut Wong et al. (2005) zumindest in vitro Targets der BACE1 dar. Allerdings ließen sich deren C-terminalen BACE1-

Spaltprodukte im Gegensatz zu denen der  $\text{Na}_v \beta 2$ - und  $\beta 4$ -Untereinheiten in primären Mäuseneuronen (kortikal, subkortikal und zerebellär) nicht nachweisen (Wong et al., 2005). Wie schon von Huth et al. (2009) für  $\text{Na}_v \beta 2$  und  $\text{Na}_v \beta 4$  beschrieben, könnte die proteolytische Spaltung der  $\beta$ -Untereinheiten die Aktivierung der Natriumkanäle beeinflussen.

Der Einfluss der  $\text{Na}_v \beta 1$  auf die Aktivierung von  $\text{Na}_v 1.2$  wird sehr widersprüchlich beschrieben (Patton et al., 1994; McEwen et al., 2004; Xu et al., 2007).  $\text{Na}_v \beta 3$  übt keinen Einfluß auf die Aktivierung aus (Merrick et al., 2009). Allerdings haben beide Untereinheiten einen konsistenten, deutlichen Einfluss auf die Steady-State Inaktivierung.  $\text{Na}_v \beta 1$  verursacht einen Shift in Richtung Hyperpolarisation, während  $\text{Na}_v \beta 3$  einen Shift in Richtung Depolarisation bewirkt. Die Messungen dieser Arbeit (Abschnitt 3.1.2 und Abb. 3.1 D) zeigen allerdings keinen Einfluss der BACE1 auf die Steady-State Inaktivierung, was anhand der Daten von Huth et al. (2009) bestätigt werden konnte.

Insgesamt lässt sich anhand dieser Daten nicht abschätzen, ob die proteolytischen Effekte der BACE1 über  $\text{Na}_v \beta 1$  und  $\text{Na}_v \beta 3$  vermittelt werden. Hier sind weitere Untersuchungen nötig. Abhängig von der Ausstattung bestimmter Zelltypen mit  $\text{Na}_v \alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten könnten sich bei einer Überexpression von BACE1 Verschiebungen der Aktivierung in Richtung Hyperpolarisation ergeben, die unter pharmakologischer BACE1-Inhibition noch verstärkt würden. Interessant ist dies insbesondere, da im Hirngewebe von AD-Patienten gesteigerte BACE1-Dichten festgestellt werden konnten (Yang et al., 2003; Li et al., 2004). Bei einer Verschiebung der Aktivierungskurven in Richtung Hyperpolarisation stehen in einem bestimmten Potentialbereich eine größere Anzahl geöffneter Natriumkanäle zur Verfügung, was in Neuronen eine erhöhte Entladungsbereitschaft zur Folge haben könnte.

Tendenziell ist die Erholung der Natriumkanäle von der Inaktivierung unter BACE1-Überexpression beschleunigt (Abschnitt 3.1.3 sowie Abb. 3.2 B bis D und Tab. 3.1). Dies würde die Entladungsbereitschaft weiter steigern. Hier könnte eine pharmakologische Inhibition im Gegensatz zur Aktivierung diesen Effekt allerdings reduzieren.

Abhängig davon, ob Interneurone oder Pyramidenzellen betroffen wären, könnte eine Imbalance zwischen neuronaler Exzitation und Inhibition resultieren. Dies wäre ein möglicher Erklärungsansatz für die erhöhte Inzidenz der mit dem Morbus Alzheimer assoziierten epileptischen Anfälle (Hauser et al., 1986; Amatniek et al., 2006).

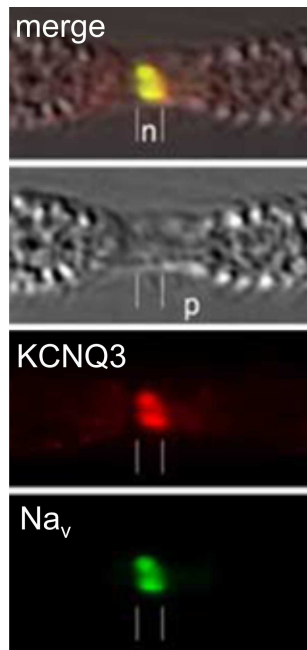
#### **4.2 KCNQ2/3-Kanäle interagieren mit Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten und werden dabei durch BACE1 beeinflusst**

In Expressionsexperimenten mit HEK293-Zellen hat die β2-Untereinheit der Natriumkanäle die Aktivierung von KCNQ2/3-Strömen in Richtung Hyperpolarisation verschoben (Abschnitt 3.3.1 und Abb. 3.4 A). Dieser Effekt setzt offenbar die komplette Na<sub>v</sub> β2-Untereinheit voraus, da unter Koexpression der Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten mit BACE1 sowie den Na<sub>v</sub> β2 ctf- und ntf-Fragmenten keine Verschiebung mehr auftrat (Abschnitt 3.4.1 sowie Abb. 3.4 A und 3.7 E). Die BACE1-Überexpression hat im Gegensatz zu den Natriumkanälen keinen proteolytisch unabhängigen Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der KCNQ2/3-Aktivierung (Huth et al., 2009).

Der gleiche Zusammenhang ergibt sich für die Deaktivierungszeitkonstanten. Na<sub>v</sub> β2 verlangsamt die Deaktivierung der KCNQ2/3-Heteromere (Abschnitt 3.3.1 und Abb. 3.4 B). Dieser Effekt kann wiederum durch BACE1 aufgehoben werden, während BACE1 keinen Eigeneffekt hat (Abschnitt 3.4.1 sowie Abb. 3.4 B und 3.7 B).

Ein etwas anderes Bild stellt sich für die Betrachtung der Zeitkonstanten der Aktivierung dar. Die Na<sub>v</sub> β2-Fragmente beschleunigen jeweils die Aktivierung, nachgewiesen durch die Koexpression von Na<sub>v</sub> β2 mit BACE1, respektive durch die Na<sub>v</sub> β2 ctf- und ntf-Fragmente (Abschnitt 3.3.1 und 3.3.4.1 sowie Abb. 3.4 B und 3.7 F). Ein nicht-proteolytischer Effekt von BACE1 ist nicht komplett ausgeschlossen, da auch die pharmakologisch inhibierte BACE1 eine Beschleunigung verursachte (Abb. 3.7 B).





Denkbar ist aber auch, dass die nicht vollständige Inhibition der BACE1 „genügend“ Fragmente entstehen lässt, um die Beschleunigung der Aktivierung zu verursachen. Hier wäre eine Kontrolle mit einer katalytisch inaktiven, humanen BACE1-Mutante nötig. Für diese Arbeit stand aber lediglich das murine Analogon zur Verfügung, das in der Kombination mit den humanen  $\text{Na}_v \beta 2$ - und KCNQ2/3-Konstrukten keine eindeutigen Ergebnisse lieferte (Abb. 3.7 D).

Abb. 4.1: **Kolokalisation von KCNQ3 und  $\text{Na}_v$  im Ranvier'schen Schnürring.** Die Übereinanderlagerung beider Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis von KCNQ3- (rot) und  $\text{Na}_v$ -Kanälen (grün) verdeutlicht deren unmittelbare Kolokalisation (gelb) im Ranvier'schen Schnürring (n; p, paranodaler Bereich; aus Pan et al., 2006).

In der Literatur gibt es eine Reihe von Befunden, die eine Interaktion von Natrium- und Kaliumkanaluntereinheiten plausibel erscheinen lassen und somit die Relevanz der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse unterstreichen. Neben der unmittelbaren neuronalen Kolokalisation und einer engen, funktionalen Kooperation der KCNQ2/3-Heteromere mit den  $\text{Na}_v 1 \alpha$ -Untereinheiten innerhalb der initialen Axonsegmente und der Ranvier'schen Schnürringe (Pan et al., 2006; Bennett und Healy, 2008; Abb. 4.1) beobachteten Deschênes und Tomaselli (2002) erstmalig eine direkte Interaktion von  $\text{Na}_v \beta$ -Untereinheiten mit den  $\alpha$ -Untereinheiten von  $\text{K}_v$ -Kanälen in HEK293-Zellen. Dabei modulierten die  $\text{Na}_v \beta 1$ -Untereinheiten die Gating-Eigenschaften und die Oberflächenexpression von  $\text{K}_v 4.3$ -Kanälen, die in kardialen Myozyten eine Hauptkomponente des  $\text{I}_{\text{to}}$ -Stromes (transient outward) bilden und somit eine wichtige Rolle bei der kardialen Repolarisation einnehmen. Gene-silencing Experimente lassen eine komplexe Interaktion der  $\text{K}_v 4$ -Kanäle mit beispielsweise KChIP2 (K<sup>+</sup>-channel interacting protein 2),  $\text{Na}_v \beta 1$  und vielleicht auch  $\text{Na}_v 1.5$  innerhalb der Multi-Protein-Signalkomplexe vermuten (Meadows und Isom, 2005; Deschênes et al., 2008).

Sowohl KCNQ2/3-, als auch  $\text{Na}_v$ -Kanäle besitzen in ihren zytoplasmatischen Domänen hochkonservierte Bindungsstellen für das Linkerprotein Ankyrin, welches unter anderem für ein kontrolliertes Targeting der Kanalproteine zu den initialen Axonsegmenten und für die Ausdifferenzierung von Axonen essentielle Bedeutung zu haben scheint (Pan et al., 2006; Rasmussen et al., 2007; Hedstrom et al., 2008; Bennett und Healy, 2008). Auch für die  $\text{Na}_v$   $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Untereinheiten konnte eine Ankyrin-vermittelte Interaktion mit zytoskelettalen Strukturen aufgezeigt werden (Malhotra et al., 2000). Somit stellt Ankyrin möglicherweise ein weiteres potentielles Bindeglied zwischen den beiden in dieser Arbeit untersuchten Kanalspezies dar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es zumindest in vitro zu einer Kanalspezies-übergreifenden Interaktion zwischen KCNQ2/3 und den  $\beta$ 2-Untereinheiten von Natriumkanälen kommt. Würde dieser Effekt in vivo auftreten, wäre vor allem in neuronalen Geweben die Erregbarkeit aufgrund einer Linksverschiebung der Aktivierung durch  $\text{Na}_v$   $\beta$ 2 auf zellulärer Ebene herabgesetzt. Eine BACE1-Überexpression würde die Erregbarkeit steigern und könnte einen epileptischen Phänotyp bedingen. In diesem Zusammenhang sei auf die Assoziation erhöhter BACE1-Level mit dem Morbus Alzheimer und der hierbei erhöhten Koinzidenz mit epileptischen Konvulsionen hingewiesen (Amatniek et al., 2006; Kim et al., 2007).

In N1E-115 Zellen traten allerdings andere Effekte auf (Abschnitt 3.5 und Abb.3.8). Das bedeutet, dass hier eine Reihe von anderen Kalium- und Natriumkanaluntereinheiten eine Rolle spielen könnten. Die Extrapolation auf in-vivo Verhältnisse ist also nur sehr begrenzt möglich, da die Komplexität der Proteininteraktionen hier wesentlich höher ist.

### 4.3 Synergistische Interaktionen der $\text{Na}_v \beta 4$ -Untereinheiten und BACE1 mit KCNQ2/3-Kanälen

Die Koexpression von  $\text{Na}_v \beta 4$  und BACE1 zusammen mit KCNQ2/3 verschiebt die Aktivierung in Richtung Hyperpolarisation (Abschnitt 3.3.3). Sowohl die Überexpression von  $\text{Na}_v \beta 4$ , als auch von BACE1 allein (Abb. 3.6 und Abb. 3.7) verursachten tendenziell eine Linksverschiebung der Aktivierungskurve, die jeweils nicht signifikant waren. Die wahrscheinlichste Erklärung ist hierbei, dass  $\text{Na}_v \beta 4$  und BACE1 synergistisch auf die Aktivierung wirken und erst in Kombination einen signifikant messbaren Effekt verursachen. Während für die Deaktivierung des KCNQ2/3-Stromes keine signifikanten Effekte beobachtet wurden, führte die Koexpression von  $\text{Na}_v \beta 4$  zu einer Beschleunigung der Aktivierungszeitkonstanten (Abb. 3.6 B). BACE1 allein führt ebenfalls zu einer Beschleunigung der Aktivierungszeitkonstanten von KCNQ2/3 (Abb. 3.7 B). Die Kombination von BACE1 mit  $\text{Na}_v \beta 4$  führte im gleichen Maße zu einer Beschleunigung der Aktivierung von KCNQ2/3, wie jeweils  $\text{Na}_v \beta 4$  und BACE1 allein, welche allerdings nur in einem Datenpunkt signifikant war (Abb. 3.6 B).

Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist, dass sich die durch BACE1 und  $\text{Na}_v \beta 4$  vermittelten Effekte auf KCNQ2/3 nicht gegenseitig ausschließen, wie es bei den  $\text{Na}_v \beta 2$ -Untereinheiten hinsichtlich der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung der Fall war (Abschnitt 3.3.1 und Abb. 3.4). Die proteolytischen Effekte von BACE1 scheinen hier also keinen Einfluss zu haben, obwohl die  $\text{Na}_v \beta 4$ -Untereinheiten nachgewiesene Substrate der BACE 1 sind (Wong et al, 2005; Kim et al., 2007; Huth et al., 2009).

Somit konnte, wie zuvor für die  $\text{Na}_v \beta 2$ -Untereinheiten, eine direkte Interaktion von Natriumkanaluntereinheiten mit Kaliumkanälen aufgezeigt werden. Die funktionellen Konsequenzen einer Linksverschiebung der Aktivierungskurve wurden bereits für die  $\text{Na}_v \beta 2$  Untereinheiten in Abschnitt 4.2 dargestellt. Im Gegensatz hierzu hätte eine pharmakologische BACE1 Inhibition keinen Effekt auf die Aktivierung.

#### **4.4 Fraglicher Einfluss von Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten und BACE1 auf homomere KCNQ2- und KCNQ3-Kanäle**

Die spannungsabhängige Aktivierung der KCNQ2- und KCNQ3-Homomere wird durch die Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten nicht beeinflusst und zumindest bei den homomeren KCNQ2-Untereinheiten haben weder die BACE1 noch die C- und N-terminalen Na<sub>v</sub> β2-Fragmente einen Effekt auf die Aktivierungskurven (Abschnitt 3.3.2). Die Aktivierungszeitkonstanten sind lediglich unter Koexpression von KCNQ2 mit den C-terminalen Na<sub>v</sub> β2-Fragmenten verlangsamt, während kein Effekt auf die Deaktivierungszeitkonstanten zu verzeichnen war (Abb. 3.5 B). Bei den KCNQ3-Homomeren sind die Deaktivierungszeitkonstanten unter Koexpression der Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten beschleunigt, während sie keinen Einfluss auf die Aktivierungskinetik haben (Abb. 3.5 D).

Anhand dieser Daten kann nicht entschieden werden, welches der beiden Homomere der mögliche Interaktionspartner von Na<sub>v</sub> β2 beziehungsweise der BACE1 ist. Vielmehr scheint es so zu sein, dass die in den Abschnitten 4.2 und 4.3 beschriebenen Effekte lediglich in der heteromeren KCNQ2/3-Konfiguration auftreten. Daher wäre eine komplexe Interaktion innerhalb von Signalosomen (Proteinkomplexe; Meadows und Isom, 2005) denkbar. Für diese Hypothese spricht beispielsweise auch, dass die M-Ströme in vivo hauptsächlich von den KCNQ2/3-Kanälen in ihrer heteromeren Konfiguration generiert werden (Schroeder et. al, 1998; Cooper et al., 2000; Brown und Passmore, 2009).

#### **4.5 Gemeinsame Abhängigkeiten der spannungsabhängigen Aktivierung von Na<sub>v</sub>1.2 und KCNQ2/3**

Im HEK293-Expressionssystem konnte für die β-Untereinheiten des spannungsabhängigen Natriumkanals und BACE1 folgender Zusammenhang gezeigt werden: Die Na<sub>v</sub> β2- und β4-Untereinheiten verschieben die Aktivierungskurven der Na<sub>v</sub>1.2-Kanäle in Richtung Hyperpolarisation (Yu et al., 2003; Huth et al., 2009). Durch die proteolytische Aktivität der BACE1 wird der β2-Effekt aufgehoben, während der β4-Effekt nicht aufgehoben wurde, da die Proteolyse der β4 keine Veränderung der Linksverschiebung bewirkt. Dafür weist die BACE1 in Abwesenheit

der Na<sub>v</sub> β2-Untereinheiten einen nicht-proteolytischen Eigeneffekt auf die Aktivierung der Na<sub>v</sub>1.2-Kanäle auf (Huth et al., 2009).

Interessanterweise konnten in dieser Arbeit vereinfacht die gleichen Abhängigkeiten der spannungsabhängigen Aktivierung unter der Kombination KCNQ2/3 mit Na<sub>v</sub> β2 bzw. Na<sub>v</sub> β4 und BACE1 gefunden werden (Abschnitt 3.3.1 sowie 3.3.3 und 3.4.1). Dies impliziert, dass die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Na<sub>v</sub>1.2- und KCNQ2/3-Kanälen in gleicher Weise von den β-Untereinheiten der Natriumkanäle und der BACE1 moduliert wird.

Durch verschiedene Expressionsmuster von Na<sub>v</sub> β2, Na<sub>v</sub> β4 und BACE1 könnte die Erregungsschwelle einer Zelle derart eingestellt werden, dass der schnelle Natriumstrom und der M-Strom sich nicht gegenseitig beeinträchtigen. Hypothetisch handelt es sich hierbei um einen interessanten Mechanismus, um die Aktionspotentialschwelle unterschiedlicher Neurone zu „tunen“.

#### **4.6 BACE1 moduliert die spannungsabhängige Aktivierung von KCNQ1/E1**

Eine BACE1-Überexpression verursachte eine Rechtsverschiebung der Aktivierungskurve von transient in HEK293-Zellen exprimierten KCNQ1/E1-Kanälen (Abschnitt 3.6.1). Die Zeitkonstanten der Aktivierung und Inaktivierung dieser Ströme, sowie die Stromdichten waren unter dem Einfluss von BACE1 nicht verändert (Abschnitt 3.6.2 und 3.6.3).

Analog zu den Natriumkanälen (Abschnitt 4.1) können wiederum 2 Hypothesen aufgestellt werden. Die veränderte Aktivierung könnte durch eine proteolytische Interaktion der BACE1 mit KCNQ α- und/oder β-Untereinheiten sowie mit anderen Proteinen aus dem „makromolekularen Signalkomplex“ (Meadows und Isom, 2005) zustande kommen. Andererseits könnte auch eine direkte, nicht-proteolytische Interaktion stattfinden, wie es schon für die Natriumkanäle gezeigt wurde (Abschnitt 4.1; Huth et al., 2009). Diese hier erhobenen Ergebnisse könnten auf eine durch die BACE1 verursachte Modulation des Aktivierungsverhaltens von KCNQ1/E1-Kanälen hindeuten.

Für die proteolytische Interaktion sprechen neue Befunde, dass die neuronal und kardial exprimierten KCNE2-Untereinheiten spannungsgesteuerter KCNQ-Kanäle als neues Substrat von sowohl der  $\alpha$ -,  $\beta$ - als auch der  $\gamma$ -Sekretase identifiziert wurden (Kim et al., 2009; Posterbeitrag und personal communication). In B104-Neuroblastomzellen und CHO-Zellen gelang es, mittels sequenzieller Prozessierung durch die entsprechenden Sekretasen die Entstehung von KCNE2-ctf und KCNE2-ICD Fragmenten zu induzieren.

Um die Frage einer direkten Interaktion zu klären, wären zwei wesentliche Kontrollen durchzuführen. Einerseits die pharmakologische oder molekularbiologische Inhibition der proteolytischen Aktivität von BACE1, andererseits sollte der KCNQ1-Strom ohne die Modulation der KCNE1-Untereinheiten untersucht werden. Aufgrund der nur geringen KCNQ1-Ströme in HEK293-Zellen müsste ein anderes Expressionssystem benutzt werden. Diese Kontrollen werden derzeit im Rahmen einer weiteren Dissertationsarbeit durchgeführt (die bis zur Fertigstellung dieser Arbeit erhobenen Resultate der Kontrollexperimente bestätigen einen in-vitro Einfluß der BACE1 auf KCNQ1/E1-Heteromere; personal communication; unveröffentlicht).

Unabhängig von den zugrundeliegenden Mechanismen verschiebt eine BACE1-Überexpression die Aktivierungskurve in Richtung Depolarisation. Eine ebenfalls in Richtung Depolarisation verschobene Aktivierungskurve der KCNQ1/E1-Kanäle wird im Rahmen einer mit dem Long QT-Syndrom (LQTS-5) assoziierten Mutation der KCNE1  $\beta$ -Untereinheiten beobachtet (Harmer et al., 2010; Splawski et al., 1997). Dabei stehen in einem für die Repolarisation des kardialen Aktionspotentials interessanten Spannungsbereich funktional weniger KCNQ1/E1-Ströme für dessen Beendigung zur Verfügung (Verlängerung der Plateauphase des Aktionspotentials). Das heterogene, kardiale Expressionsmuster der  $I_{KS}$ -Kanäle (Liu und Antzelevitch, 1995) und die hierdurch bedingte, regional unterschiedliche Ausstattung an KCNE1-Mutanten begünstigt die Entstehung inhomogener Aktionspotentialzeiten (Splawski et al., 1997). Zudem führt eine verzögerte myokardiale Repolarisation zu einer intrazellulären Anhäufung von Kalziumionen (verzögerte Inaktivierung depolarisierender  $Ca^{2+}$ -Kanäle) und damit zur Generierung von frühen Nachdepolarisationen (EADs, early after depolarizations; Roden, 1993; Sato et al., 2009). Sowohl die unter dem LQT-Syndrom auftretenden irregulären Refraktärzeiten,

als auch die EADs begünstigen die Entstehung und Erhaltung kardialer Reentry-Kreisläufe (kreisende Erregungen). Diese äußern sich elektrokardiographisch in den für das Long QT-Syndrom charakteristischen und potentiell letalen, polymorphen ventrikulären Tachykardien (Torsade de Pointes Tachykardie; Dessertenne, 1966).

Demnach könnte der beobachtete BACE1-Effekt in ähnlicher Weise wie die LQT5-Mutation in vivo die kardiale Elektrophysiologie beeinflussen. Zum einen wird die BACE1 im kardialen Gewebe in relevanter Dichte exprimiert (personal communication: A. Rittger; Institut für Biochemie Universität Kiel, Deutschland und D. Y. Kim, Harvard Medical School, Charlestown, MA, USA) und konnte überdies auch in humanen Herzgeweben nachgewiesen werden (Yan et al., 1999), zum anderen besteht eine Koinzidenz zwischen den verschiedenen Demenzformen und der im Alter auftretenden, erhöhten Prävalenz des Vorhof- bzw. des Kammerflimmerns (Ott et al., 1997; Zulli et al., 2005).

## 5. Zusammenfassung

Das  $\beta$ -site-amyloid-precursor-protein(APP)-cleaving-enzyme1 (BACE1) spielt in der Pathogenese der Alzheimer'schen Demenz eine wichtige Rolle. Die pharmakologische Inhibition der BACE1 stellt eine aussichtsreiche Therapiemöglichkeit des Morbus Alzheimer dar. Neben ihrer pathophysiologischen Bedeutung wird auch zunehmend die physiologische Funktion der BACE1 entschlüsselt. So sind kürzlich auch Untereinheiten spannungsgesteuerter Natriumkanäle als Zielstrukturen der BACE1 identifiziert worden.

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der BACE1 auf die Kanalfunktion sowohl von neuronalen Natrium- und Kaliumkanälen, als auch von kardialen Kaliumkanälen im Expressionssystem elektrophysiologisch zu charakterisieren. Außerdem wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen spannungsabhängigen Kaliumkanälen und den  $\beta$ -Untereinheiten von Natriumkanälen gibt. Folgende Zusammenhänge wurden in dieser Arbeit gefunden:

1.) In N1E-Zellen führt die katalytisch aktive BACE1 zu einer Verschiebung der Aktivierungskurven intrinsischer Natriumkanäle um 12.2 mV in Richtung Hyperpolarisation. Die pharmakologische Inaktivierung der intrinsischen bzw. überexprimierten BACE1 bewirkt eine, im Vergleich zum jeweils katalytisch aktiven Analogon, um 4.9 mV bzw. 4.5 mV weiter in Richtung Hyperpolarisation verschobene Aktivierung. Diese Ergebnisse legen nahe, dass BACE1 sowohl proteolytisch, als auch direkt mit Natriumkanaluntereinheiten interagiert.

2.) Unter Einfluss der  $\beta$ 2-Natriumkanaluntereinheiten ist die Aktivierung heteromerer KCNQ2/3-Kaliumkanäle in HEK293-Zellen um 6.2 mV in Richtung Hyperpolarisation verschoben. Die Deaktivierungszeitkonstanten sind verzögert.  $\beta$ 4 bewirkt hingegen eine Beschleunigung der Aktivierung von KCNQ2/3-Kanälen, ohne deren spannungsabhängige Aktivierung zu beeinflussen. Diese Daten zeigen, dass es in vitro zu einer Interaktion der  $\alpha$ -Untereinheiten von Kaliumkanälen mit  $\beta$ -Untereinheiten von Natriumkanälen kommt.



3.) Die in 2.) genannten Effekte der  $\beta 2$ -Natriumkanaluntereinheiten auf KCNQ2/3-Kaliumströme lassen sich durch eine BACE1-vermittelte proteolytische Spaltung aufheben. Im Gegensatz dazu wird der Effekt der  $\beta 4$ -Untereinheiten auf die Aktivierung von KCNQ2/3-Kanälen unter Einfluss von BACE1 verstärkt (Linksverschiebung um 7.3 mV und verzögerte Deaktivierung).

4.) Im HEK293-System verursacht BACE1 eine Verschiebung der Aktivierungskurve von KCNQ1/E1-Kanälen um 12.3 mV in Richtung Depolarisation.

Insgesamt zeigt diese Arbeit, dass es in vitro zu einem komplexen Zusammenspiel von BACE1, KCNQ-Kaliumkanälen und den  $\beta 2/ \beta 4$ -Untereinheiten von Natriumkanälen kommt. Dies lässt sich anhand von elektrophysiologischen Parametern quantifizieren.

Eine Extrapolation auf in vivo Verhältnisse ist an dieser Stelle nicht möglich, da dies die Kenntnis aller beteiligten Ionenkanaluntereinheiten und Interaktionen mit der BACE1 voraussetzt.

Außerdem zeigt diese Arbeit, dass eine im Rahmen des Morbus Alzheimer vorliegende Überexpression der BACE1 bzw. deren pharmakologische Inhibition wahrscheinlich zu einer Änderung der Elektrophysiologie von erregbaren Zellen führt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abbott, G. W. und S. A. Goldstein. "Potassium channel subunits encoded by the KCNE gene family: physiology und pathophysiology of the MinK-related peptides (MiRPs)." Mol.Interv. 1.2 (2001): 95-107.
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I. R., McGeer, P. L., O'Banion, M. K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F. L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., Wyss-Coray, T. "Inflammation and Alzheimer's disease." Neurobiol.Aging 21.3 (2000): 383-421.
- Alberts, G. L., J. F. Pregonzer, und W. B. Im. "Advantages of heterologous expression of human D2long dopamine receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y over human embryonic kidney 293 cells." Br.J.Pharmacol. 131.3 (2000): 514-20.
- Alzheimer, A. "Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters." Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie 4 (1911): 356-385.
- Amano, T., E. Richelson, und M. Nirenberg. "Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline acetyltransferase-acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites)." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 69.1 (1972): 258-63.
- Amatniek, J. C., Hauser, W. A., DelCastillo-Castaneda, C., Jacobs, D. M., Marder, K., Bell, K., Albert, M. Brandt, J., Stern, Y. "Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease." Epilepsia 47.5 (2006): 867-72. Avila, G., A. Sandoval, und R. Felix. "Intramembrane charge movement associated with endogenous K<sup>+</sup> channel activity in HEK-293 cells." Cell Mol.Neurobiol. 24.3 (2004): 317-30.
- Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., Romey, G. "K(V)LQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current." Nature 384.6604 (1996): 78-80.
- Bennett, V. und J. Healy. "Being there: cellular targeting of voltage-gated sodium channels in the heart." J.Cell Biol. 180.1 (2008): 13-15.
- Benzinger, R. G., Tonkovich, G. S. und D. A. Hanck. "Augmentation of recovery from inactivation by site-3 Na channel toxins. A single-channel and whole-cell study of persistent currents." J.Gen.Physiol. 113.2 (1999): 333-46.
- Braak, H. und E. Braak. "Development of Alzheimer-related neurofibrillary changes in the neocortex inversely recapitulates cortical myelogenesis." Acta Neuropathol. 92.2 (1996): 197-201.
- Brown, B. S. und S. P. Yu. "Modulation and genetic identification of the M channel." Prog.Biophys.Mol.Biol. 73.2-4 (2000): 135-66.
- Brown, D. A. und P. R. Adams. "Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K<sup>+</sup> current in a vertebrate neurone." Nature 283.5748 (1980): 673-76.
- Brown, D. A. und G. M. Passmore. "Neural KCNQ (Kv7) channels." Br.J.Pharmacol. 156.8 (2009): 1185-95.

- Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P., Black, R. A. "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." J.Biol.Chem. 273.43 (1998): 27765-67.
- Cao, X. und T.C. Sudhof. "Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation." J.Biol.Chem. 279. (2004): 24601-11.
- Catterall, W. und P. N. Epstein. "Ion channels." Diabetologia 35 Suppl 2: S23-33. (1992): S23-S33.
- Catterall, W. A. "From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels." Neuron 26.1 (2000): 13-25.
- Catterall, W. A., Dib-Hajj, S., Meisler, M. H., Pietrobon, D. "Inherited neuronal ion channelopathies: new windows on complex neurological diseases." J.Neurosci. 28.46 (2008): 11768-77.
- Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., Striessnig, J. "International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels." Pharmacol.Rev. 57.4 (2005): 411-25.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C. "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science 263.5148 (1994): 802-05.
- Charlier, C., Singh, N. A., Ryan, S. G., Lewis, T. B., Reus, B. E., Leach, R. J., Leppert, M. "A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family." Nat.Genet. 18.1 (1998): 53-55.
- Chung, H. J., Y. N. Jan, und L. Y. Jan. "Polarized axonal surface expression of neuronal KCNQ channels is mediated by multiple signals in the KCNQ2 and KCNQ3 C-terminal domains." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 103.23 (2006): 8870-75.
- Cole, K. S. "Some physical aspects of bioelectric phenomena." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 35.10 (1949): 558-66.
- Cole, S. L. und R. Vassar. "The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1." Mol.Neurodegener. 2:22. (2007a): 22.
- Cole, S. L. und R. Vassar. "The Basic Biology of BACE1: A Key Therapeutic Target for Alzheimer's Disease." Curr.Genomics 8.8 (2007b): 509-30.
- Cole, S. L. und R. Vassar. "The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the beta-secretase, in Alzheimer disease pathophysiology." J.Biol.Chem. 283.44 (2008): 29621-25.
- Cole, S. L. und R. Vassar. "Linking vascular disorders and Alzheimer's disease: potential involvement of BACE1." Neurobiol.Aging 30.10 (2009): 1535-44.
- Cooper, E. C., Aldape, K. D., Abosch, A., Barbaro, N. M., Berger, M. S., Peacock, W. S., Jan, Y. N., Jan, L. Y. "Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 97.9 (2000): 4914-19.

- Cooper, E. C. und L. Y. Jan. "M-channels: neurological diseases, neuromodulation, and drug development." Arch.Neurol. 60.4 (2003): 496-500.
- Cordeiro, J. M., K. W. Spitzer, und W. R. Giles. "Repolarizing K<sup>+</sup> currents in rabbit heart Purkinje cells." J.Physiol. 508.Pt 3 (1998): 811-23.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A. "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." Science 261.5123 (1993): 921-23.
- Cormack, B. P., R. H. Valdivia, und S. Falkow. "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)." Gene 173.1 Spec No (1996): 33-38.
- Coté R.J. "Aseptic technique for cell culture." Curr.Protoc.Cell Biol. Chapter 1:Unit 1.3. (2001).
- Deamer, D., Dworkin, J. P., Sandford, S. A., Bernstein, M. P., Allamandola, L. J. "The first cell membranes." Astrobiology 2.4 (2002): 371-81.
- Deamer, D. W. "The first living systems: a bioenergetic perspective." Microbiol.Mol.Biol.Rev. 61.2 (1997): 239-61.
- Deamer, D. W. und J. Oro. "Role of lipids in prebiotic structures." Biosystems 12.3-4 (1980): 167-75.
- Deschenes, I., Armondas, A. A., Jones, S. P., Tomaselli, G. F. "Post-transcriptional gene silencing of KChIP2 and Navbeta1 in neonatal rat cardiac myocytes reveals a functional association between Na and Ito currents." J. Mol.Cell Cardiol. 45.3 (2008): 336-46.
- Deschenes, I. und G. F. Tomaselli. "Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits." FEBS Lett. 528.1-3 (2002): 183-88.
- Dessertenne, F. "[Ventricular tachycardia with 2 variable opposing foci]." Arch.Mal Coeur. Vaiss. 59.2 (1966): 263-72.
- Dominguez, D., Tournoy, J., Hartmann, D., Huth, T., Cryns, K., Deforce, S., Serneels, L., Camacho, I. E., Marjaux, E., Craessaerts, K., Roebroek, A. J., Schwake, M., D'Hooge, R., Bach, P., Kalinke, U., Moechars, D., Alzheimer, C., Reiss, K., Saftig, P., De Strooper, B. "Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice." J.Biol.Chem. 280.35 (2005): 30797-806.
- Esler, W. P. und M. S. Wolfe. "A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces." Science 293.5534 (2001): 1449-54.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P. R., Rimmer, E., Scazufca, M. "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study." Lancet 366.9503 (2005): 2112-17.
- Fishman, M. C. und I. Spector. "Potassium current suppression by quinidine reveals additional calcium currents in neuroblastoma cells." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 78.8 (1981): 5245-49.

- Fröscher, W., Vasella, F., Hufnagel, A. "Die Epilepsien: Grundlagen - Klinik - Behandlung." 2. Auflage (2004). Schattauer Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- Garlind, A., Brauner, A., Hojeberg, B., Basun, H., Schultzberg, M. "Soluble interleukin-1 receptor type II levels are elevated in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease patients." Brain Res. 826.1 (1999): 112-16.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L. "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." Nature 349.6311 (1991): 704-06.
- Golde, T. E., D. Dickson, und M. Hutton. "Filling the gaps in the abeta cascade hypothesis of Alzheimer's disease." Curr.Alzheimer Res. 3.5 (2006): 421-30.
- Goldin, A. L., Barchi, R. L., Caldwell, J. H., Hofmann, F., Howe, J. R., Hunter, J. C., Kallen, R. G., Mandel, G., Meisler, M. H., Netter, Y. B., Noda, M., Tamkun, M. M., Waxman, S. G., Wood, J. N., Catterall, W. A. "Nomenclature of voltage-gated sodium channels." Neuron 28.2 (2000): 365-68.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R. "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J.Gen.Virol. 36.1 (1977): 59-74.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Adelman, J. P., Aiyar, J., Bayliss, D. A., Clapham, D. E., Covarrubias, M., Desir, G. V., Furuichi, K., Ganetzky, B., Garcia, M. L., Grissmer, S., Jan, L. Y., Karschin, A., Kim, D., Kuperschmidt, S., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Lesage, F., Lester, H. A., McKinnon, D., Nichols, C. G., O'Kelly, I., Robbins, J., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M., Seino, S., Stuehmer, W., Tamkun, M. M., Vandenberg, C. A., Wei, A., Wulff, H., Wymore, R. S. "International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels." Pharmacol.Rev. 55.4 (2003): 583-86.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stuehmer, W., Wang, X. "International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels." Pharmacol.Rev. 57.4 (2005): 473-508.
- Hahn, A. und B. A. Neubauer. "Sodium and potassium channel dysfunctions in rare and common idiopathic epilepsy syndromes." Brain Dev. 31.7 (2009): 515-20.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F. J. "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Arch. 391.2 (1981): 85-100.
- Hardy, J. "Does Abeta 42 have a function related to blood homeostasis?" Neurochem.Res. 32.4-5 (2007): 833-35.
- Harmer, S. C., Wilson, A. J., Aldridge, R., Tinker, A. "Mechanisms of disease pathogenesis in long QT syndrome type 5." Am.J.Physiol.Cell Physiol. 298.2 (2010): C263-C273.
- Harrison, S. M., Harper, A. J., Hawkins, J., Duddy, G., Grau, E., Pugh, P. L., Winter, P. H., Shilliam, C. S., Hughes, Z. A., Dawson, L. A., Gonzalez, M. I., Upton, N., Pangalos, M. N., Dingwall, C. "BACE1 (beta-secretase) transgenic and knockout mice: identification of neurochemical deficits and behavioral changes." Mol.Cell Neurosci. 24.3 (2003): 646-55.

- Hauser, W. A., Morris, M. L., Heston, L. L., Anderson, V. E. "Seizures and myoclonus in patients with Alzheimer's disease." Neurology 36.9 (1986): 1226-30.
- Hedstrom, K. L., Y. Ogawa, und M. N. Rasband. "AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity." J.Cell Biol. 183.4 (2008): 635-40.
- Hedstrom, K. L., Y. Ogawa, und M. N. Rasband. "AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity." J.Cell Biol. 183.4 (2008): 635-40.
- Hille, B. "Ion channels of excitable membranes." 3rd edition (2001). Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hirose, S., Zenri, F., Akiyoshi, H., Fukuma, G., Iwata, H., Inoue, T., Yonetani, M., Tsutsumi, M., Muranaka, H., Kurokawa, T., Hanai, T., Wada, K., Kaneko, S., Mitsudome, A. "A novel mutation of KCNQ3 (c.925T-->C) in a Japanese family with benign familial neonatal convulsions." Ann.Neurol. 47.6 (2000): 822-26.
- Hodgkin, A. L., A. F. Huxley und B. Katz. "Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid." Arch.Sci.Physiol. 3 (1949): 129-150.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., Malinow, R. "AMPA removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss." Neuron 52.5 (2006): 831-43.
- Hu, X., He, W., Diaconu, C., Tang, X., Kidd, G.J., Macklin, W.B., Trapp, B. D., Yan, R. "Genetic deletion of BACE1 in mice affects remyelination of sciatic nerves." FASEB J. 22.8 (2008): 2970-80.
- Hu, X., Hicks, C. W., He, W., Wong, P., Macklin, W. B., Trapp, B. D., Yan, R. "Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system." Nat.Neurosci. 9.12 (2006): 1520-25.
- Huse, J. T., Byant, D., Yang, Y., Pijak, D. S., D'Souza, I., Lah, J. J., Lee, V. M., Doms, R. W., Cook, D. G. "Endoproteolysis of beta-secretase (beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme) within its catalytic domain. A potential mechanism for regulation." J. Biol.Chem. 278.19 (2003): 17141-49.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D. R., Tew, D. G., Meek, T. D., Chapman, C., Gloger, I. S., Murphy, K. E., Southan, C. D., Ryan, D. M., Smith, T. S., Simmons, D. L., Walsh, F. S., Dingwall, C., Christie, G. "Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase." Mol.Cell Neurosci. 14.6 (1999): 419-27.
- Huth, T., Schmidt-Neuenfeldt, K., Rittger, A., Saftig, P., Reiss, K., Alzheimer, C. "Non-proteolytic effect of beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) on sodium channel function." Neurobiol.Dis. 33.2 (2009): 282-89.
- Isom, L. L. "Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary." Neuroscientist 7.1 (2001): 42-54.
- Isom, L. L. und W. A. Catterall. "Na<sup>+</sup> channel subunits and Ig domains." Nature 383.6598 (1996): 307-08.
- Isom, L. L., De Jongh, K. S., Patton, D. E., Reber, B. F., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A. L., Catterall, W. A. "Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel." Science 256.5058 (1992): 839-42.

- Isom, L. L., Ragsdale, D. S., De Jongh, K. S., Westenbroek, R. E., Reber, B. F., Scheuer, T., Catterall, W. A. "Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif." Cell 83.3 (1995): 433-42.
- Jentsch, T. J. "Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease." Nat. Rev.Neurosci. 1.1 (2000): 21-30.
- Jiang, B., Sun, X., Cao, K., Wang, R. "Endogenous Kv channels in human embryonic kidney (HEK-293) cells." Mol.Cell Biochem. 238.1-2 (2002): 69-79.
- Kaczmarek, L. K. "Non-conducting functions of voltage-gated ion channels." Nat. Rev.Neurosci. 7.10 (2006): 761-71.
- Kang, D. E., Pietrzik, C. U., Baum, L., Chevallier, N., Merriam, D. E., Kounnas, M. Z., Wagner, S. L., Troncoso, J. C., Kawas, C. H., Katzman, R., Koo, E. H. "Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway." J.Clin.Invest. 106.9 (2000): 1159-66.
- Kearney, J. A., Yang, Y., Beyer, B., Bergren, S. K., Claes, L., Dejonghe, P., Frankel, W. N. "Severe epilepsy resulting from genetic interaction between Scn2a and Kcnq2." Hum.Mol.Genet. 15.6 (2006): 1043-48.
- Kim, D. Y., Ingano, L. A., Carey, B. W., Pettingell, W. H., Kovacs, D. M. "Presenilin/gamma-secretase-mediated cleavage of the voltage-gated sodium channel beta2-subunit regulates cell adhesion and migration." J.Biol.Chem. 280.24 (2005): 23251-61.
- Kim, D. Y., Carey, B. W., Wang, H., Ingano, L. A., Binshtok, A. M., Wertz, M. H., Pettingell, W. H., He, P., Lee, V. M., Woolf, C. J., Kovacs, D. M. "BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity." Nat.Cell Biol. 9.7 (2007): 755-64.
- Kim, D. Y., Gersbacher, M. T., Sachse, C. C., Pettingell, W. H., Kovacs, D. M. "KCNE2, an auxiliary subunit of the voltage-gated potassium channel undergoes sequential processing mediated by BACE1,  $\alpha$ -secretase and presenilin/ $\gamma$ -secretase." 39th annual meeting of the Society for Neuroscience. Program No. 599.1 (2009). Chicago, IL.
- Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T. C., Hashimoto, Y. "Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 20, 98.24 (2001): 13554-59.
- Kivipelto, M., Helkala, E. L., Laakso, M. P., Hanninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Iivonen, S., Mannermaa, A., Tuomilehto, J., Nissinen, A., Soininen, H. "Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease." Ann.Intern.Med. 137.3 (2002a): 149-55.
- Kivipelto, M., Laakso, M. P., Tuomilehto, J., Nissinen, A., Soininen, H. "Hypertension and hypercholesterolaemia as risk factors for Alzheimer's disease: potential for pharmacological intervention." CNS Drugs 16.7 (2002b): 435-44.
- Klockner, U. und G. Isenberg. "ATP suppresses activity of Ca(2+)-activated K+ channels by Ca2+ chelation." Pflugers Arch. 420.1 (1992): 101-05.
- Koo, E. H. und S. L. Squazzo. "Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway." J.Biol.Chem. 269.26 (1994): 17386-89.

- Kostyuk, P. G., Krishtal, O. A., Pidoplichko, V. I., Veselovsky, N. S. "Ionic currents in the neuroblastoma cell membrane." Neuroscience 3.3 (1978): 327-32.
- Kuhn, P. H., Marjaux, E., Imhof, A., De Strooper, B., Haass, C., Lichtenthaler, S. F. "Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase." J.Biol.Chem. 20;282.16 (2007): 11982-95.
- Kurejova, M., Uhrik, B., Sulova, Z., Sedlakova, B., Krizanova, O., Lacinova, L. "Changes in ultrastructure and endogenous ionic channels activity during culture of HEK 293 cell line." Eur.J.Pharmacol. 567.1-2 (2007): 10-18.
- Lai, H. C. und L. Y. Jan. "The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels." Nat.Rev.Neurosci. 7.7 (2006): 548-62.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., Fahrenholz, F. "Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 96.7 (1999): 3922-27.
- Lampert, A., O'Reilly, A. O., Reeh, P., Leffler, A. "Sodium channelopathies and pain." Pflugers Arch. (2010).
- Lerche, C., Scherer, C. R., Seebohm, G., Derst, C., Wei, A. D., Busch, A. E., Steinmeyer, K. "Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity." J.Biol.Chem. 275.29 (2000): 22395-400.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., Yu, C. E., Jondro, P. D., Schmidt, S. D., Wang, K. "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." Science 269.5226 (1995): 973-77.
- Li, Q. und T. C. Sudhof. "Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1." J.Biol.Chem. 279.11 (2004): 10542-50.
- Li, R., Lindholm, K., Yang, L. B., Yue, X., Citron, M., Yan, R., Beach, T., Sue, L., Sabbagh, M., Cai, H., Wong, P., Price, D., Shen, Y. "Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 101.10 (2004): 3632-37.
- Lichtenthaler, S. F., Dominguez, D. I., Westmeyer, G. G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper B., Seed, B. "The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1." J.Biol.Chem. 278.49 (2003): 48713-19.
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., Tang, J. "Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 97.4 (2000): 1456-60.
- Liu, D. W. und C. Antzelevitch. "Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker IKs contributes to the longer action potential of the M cell." Circ.Res. 76.3 (1995): 351-65.



- Lleo, A., Waldron, E., von Arnim, C. A., Herl, L., Tangredi, M. M., Peltan, I. D., Strickland, D. K., Koo, E. H., Hyman, B. T., Pietrzik, C. U., Berezovska, O. "Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) interacts with presenilin 1 and is a competitive substrate of the amyloid precursor protein (APP) for gamma-secretase." J.Biol.Chem. 280.29 (2005): 27303-09.
- Loussouarn, G., Charpentier, F., Mohammad-Panah, R., Kunzelmann, K., Baro, I., Escande, D. "KvLQT1 potassium channel but not Isk is the molecular target for trans-6-cyano-4-(N-ethylsulfonyl-N-methylamino)-3-hydroxy-2,2-dimethyl- chromane." Mol.Pharmacol. 52.6 (1997): 1131-36.
- MacKinnon, R. "Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel." Nature 350.6315 (1991a): 232-35.
- MacKinnon, R. "New insights into the structure and function of potassium channels." Curr.Opin.Neurobiol. 1.1 (1991b): 14-19.
- MacKinnon, R. "Using mutagenesis to study potassium channel mechanisms." J. Bioenerg.Biomembr. 23.4 (1991c): 647-63.
- Maier, S. K., Westenbroek, R. E., McCormick, K. A., Curtis, R., Scheuer, T., Catterall, W. A. "Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart." Circulation 109.11 (2004): 1421-27.
- Maier, S. K., Westenbroek, R. E., Yamanushi, T. T., Dobrzynski, H., Boyett, M. R., Catterall, W. A., Scheuer, T. "An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 100.6 (2003): 3507-12.
- Main, M. J., Cryan, J. E., Dupere, J. R., Cox, B., Clare, J. J., Burbidge, S. A. "Modulation of KCNQ2/3 potassium channels by the novel anticonvulsant retigabine." Mol.Pharmacol. 58.2 (2000): 253-62.
- Malamas, M. S., Erdei, J., Gunawan, I., Barnes, K., Johnson, M., Hui, Y., Turner, J., Hu, Y., Wagner, E., Fan, K., Olland, A., Bard, J., Robichaud, A. J. "Aminoimidazoles as potent and selective human beta-secretase (BACE1) inhibitors." J.Med.Chem. 52.20 (2009): 6314-23.
- Malhotra, J. D., Kazen-Gillespie, K., Hortsch, M., Isom, L. L. "Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact." J.Biol.Chem. 275.15 (2000): 11383-88.
- Maness P. F. und M. Schachner. "Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration." Nat. Neurosci. 10 (1) (2007): 19-26.
- Marrion, N. V. "Control of M-current." Annu.Rev.Physiol. 59:483-504. (1997): 483-504.
- McCrossan, Z. A. und G. W. Abbott. "The MinK-related peptides." Neuropharmacology. 47.6 (2004): 787-821.
- McEwen, D. P., Meadows, L. S., Chen, C., Thyagarajan, V., Isom, L. L. "Sodium channel beta1 subunit-mediated modulation of Nav1.2 currents and cell surface density is dependent on interactions with contactin and ankyrin." J.Biol.Chem. 279.16 (2004): 16044-49.

- Meadows, L. S. und L. L. Isom. "Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes." Cardiovasc.Res. 67.3 (2005): 448-58.
- Meisler, M. H., Kearney, J., Ottman, R., Escayg, A. "Identification of epilepsy genes in human and mouse." Annu.Rev.Genet. 35:567-88. (2001): 567-88.
- Merrick, E. C., Kalmar, C. L., Snyder, S. L., Cusdin, F. S., Yu, E. J., Sando, J. J., Isakson, B. E., Jackson, A. P., Patel, M. K. "The importance of serine 161 in the sodium channel beta3 subunit for modulation of Na(V)1.2 gating." Pflugers Arch. (2009).
- Miyazaki, H., Oyama, F., Wong, H. K., Kaneko, K., Sakurai, T., Tamaoka, A., Nukina, N. "BACE1 modulates filopodia-like protrusions induced by sodium channel beta4 subunit." Biochem.Biophys.Res.Comm. 361.1 (2007): 43-48.
- Moolenaar, W. H. und I. Spector. "Ionic currents in cultured mouse neuroblastoma cells under voltage-clamp conditions." J.Physiol. 278:265-86. (1978): 265-86.
- Moran, O., M. Nizzari, und F. Conti. "Endogenous expression of the beta1A sodium channel subunit in HEK-293 cells." FEBS Lett. 473.2 (2000): 132-34.
- Morgan, K., Stevens, E. B., Shah, B., Cox, P. J., Dixon, A. K., Lee, K., Pinnock, R. D., Hughes, J., Richardson, P. J., Mizuguchi, K., Jackson, A. P. "beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 97.5 (2000): 2308-13.
- Naderi, J., C. Lopez, und S. Pandey. "Chronically increased oxidative stress in fibroblasts from Alzheimer's disease patients causes early senescence and renders resistance to apoptosis by oxidative stress." Mech.Ageing Dev. 127.1 (2006): 25-35.
- Nagy, K., T. Kiss, und D. Hof. "Single Na channels in mouse neuroblastoma cell membrane. Indications for two open states." Pflugers Arch. 399.4 (1983): 302-08.
- Nawrot, B. "Targeting BACE with small inhibitory nucleic acids - a future for Alzheimer's disease therapy?" Acta Biochim.Pol. 51.2 (2004): 431-44.
- Numberger, M. und A. Draguhn. "Patch-Clamp-Technik" 1. Auflage (1996). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford.
- Ohya, S., Asakura, K., Muraki, K., Watanabe, M., Imaizumi, Y. "Molecular and functional characterization of ERG, KCNQ, and KCNE subtypes in rat stomach smooth muscle." Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol. 282.2 (2002): G277-G287.
- Ott, A., Breteler, M. M., de Bruyne, M. C., van Harskamp, F., Grobbee, D. E., Hofman, A. "Atrial fibrillation and dementia in a population-based study. The Rotterdam Study." Stroke 28.2 (1997): 316-21.
- Pan, Z., Kao, T., Horvath, Z., Lemos, J., Sul, J. Y., Cranstoun, S. D., Bennett, V., Scherer, S. S., Cooper, E. C. "A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon." J.Neurosci. 26.10 (2006): 2599-613.
- Papazian, D. M. "Potassium channels: some assembly required." Neuron 23.1 (1999): 7-10.
- Patton, D. E., Isom, L. L., Catterall, W. A., Goldin, A. L. "The adult rat brain beta 1 subunit modifies activation and inactivation gating of multiple sodium channel alpha subunits." J.Biol.Chem. 269.26 (1994): 17649-55.

- Piazzzi, L., Cavalli, A., Colizzi, F., Belluti, F., Bartolini, M., Mancini, F., Recanatini, M., Andrisano, V., Rampa, A. "Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds." Bioorg.Med.Chem.Lett. 18.1 (2008): 423-26.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., Cormier, M. J. "Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein." Gene 111.2 (1992): 229-33.
- Rasmussen, H. B., Frokjaer-Jensen, C., Jensen, C. S., Jensen, H. S., Jorgensen, N. K., Misonou, H., Trimmer, J. S., Olesen, S. P., Schmitt, N. "Requirement of subunit co-assembly and ankyrin-G for M-channel localization at the axon initial segment." J.Cell Sci. 120.Pt 6 (2007): 953-63.
- Rivera-Arconada, I., C. Roza, und J. A. Lopez-Garcia. "Enhancing m currents: a way out for neuropathic pain?" Front.Mol.Neurosci. 2:10. Epub; 2009 Aug 4. (2009): 10.
- Robbins, J. "KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology." Pharmacol.Ther. 90.1 (2001): 1-19.
- Roberds, S. L., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M. J., Branstetter, D. G., Chen, K. S., Freedman, S. B., Frigon, N. L., Games, D., Hu, K., Johnson-Wood, K., Kappenman, K. E., Kawabe, T. T., Kola, I., Kuehn, R., Lee, M., Liu, W., Motter, R., Nichols, N. F., Power, M., Robertson, D. W., Schenk, D., Schoor, M., Shopp, G. M., Shuck, M. E., Sinha, S., Svensson, K. A., Tatsuno, G., Tintrup, H., Wijsman, J., Wright, S., McConlogue, L. "BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics." Hum.Mol.Genet. 10.12 (2001): 1317-24.
- Rockenstein, E., Mante, M., Alford, M., Adame, A., Crews, L., Hashimoto, M., Esposito, L., Mucke, L., Masliah, E. "High beta-secretase activity elicits neurodegeneration in transgenic mice despite reductions in amyloid-beta levels: implications for the treatment of Alzheimer disease." J.Biol.Chem. 280.38 (2005): 32957-67.
- Roden, D. M. "Early after-depolarizations and torsade de pointes: implications for the control of cardiac arrhythmias by prolonging repolarization." Eur.Heart J. 14 Suppl H:56-61. (1993): 56-61.
- Ronen, G. M., Rosales, T. O., Connolly, M., Anderson, V. E., Leppert, M. "Seizure characteristics in chromosome 20 benign familial neonatal convulsions." Neurology 43.7 (1993): 1355-60.
- Rosenberg, P. B. "Clinical aspects of inflammation in Alzheimer's disease." Int.Rev.Psychiatry. 17.6 (2005): 503-14.
- Rossner, S., Apelt, J., Schliebs, R., Perez-Polo, J. R., Bigl, V. "Neuronal and glial beta-secretase (BACE) protein expression in transgenic Tg2576 mice with amyloid plaque pathology." J.Neurosci.Res. 64.5 (2001): 437-46.
- Salata, J. J., Jurkiewicz, N. K., Jow, B., Folander, K., Guinasso, P. J. Jr., Raynor, B., Swanson, R., Fermini, B. "IK of rabbit ventricle is composed of two currents: evidence for IKs." Am.J.Physiol. 271.6 Pt 2 (1996): H2477-H2489.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis. "Molecular Cloning: a laboratory manual." 3rd edition (1998). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

- Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L., Keating, M. T. "Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel." Nature 384.6604 (1996): 80-83.
- Sato, D., Xie, L. H., Sovari, A. A., Tran, D. X., Morita, N., Xie, F., Karagueuzian, H., Garfinkel, A., Weiss, J. N., Qu, Z. "Synchronization of chaotic early afterdepolarizations in the genesis of cardiac arrhythmias." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 106.9 (2009): 2983-88.
- Savonenko, A. V., Melnikova, T., Laird, F. M., Stewart, K. A., Price, D. L., Wong, P. C. "Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 105.14 (2008): 5585-90.
- Scheinfeld, M. H., Ghersi, E., Laky, K., Fowlkes, B. J., D'Adamio, L. "Processing of beta-amyloid precursor-like protein-1 and -2 by gamma-secretase regulates transcription." J.Biol.Chem. 277.46 (2002): 44195-201.
- Schellenberg, G. D., Bird, T. D., Wijsman, E. M., Orr, H. T., Anderson, L., Nemens, E., White, J. A., Bonnycastle, L., Weber, J. L., Alonso, M. E. "Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14." Science 258.5082 (1992): 668-71.
- Schmidt, R. F. und F. Lang. "Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie." 30. Auflage (2007), Springer Verlag, Berlin.
- Schroeder, B. C., Hechenberger, M., Weinreich, F., Kubisch, C., Jentsch, T. J. "KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents." J.Biol.Chem. 275.31 (2000): 24089-95.
- Schroeder, B. C., Kubisch, C., Stein, V., Jentsch, T. J. "Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K<sup>+</sup> channels causes epilepsy." Nature 396.6712 (1998): 687-90.
- Schwake, M., Athanasiadu, D., Beimgraben, C., Blanz, J., Beck, C., Jentsch, T. J., Saftig, P., Friedrich, T. "Structural determinants of M-type KCNQ (Kv7) K<sup>+</sup> channel assembly." J. Neurosci. 26.14 (2006): 3757-66.
- Schwake, M., Pusch, M., Kharkovets, T., Jentsch, T. J. "Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K<sup>+</sup> channels involved in epilepsy." J.Biol.Chem. 275.18 (2000): 13343-48.
- Shapiro, M. S., Roche, J. P., Kaftan, E. J., Cruzblanca, H., Mackie, K., Hille, B. "Reconstitution of muscarinic modulation of the KCNQ2/KCNQ3 K(+) channels that underlie the neuronal M current." J.Neurosci. 20.5 (2000): 1710-21.
- Shastri, P., A. Basu, und M. S. Rajadhyaksha. "Neuroblastoma cell lines--a versatile in vitro model in neurobiology." Int.J.Neurosci. 108.1-2 (2001): 109-26.
- Silvestri, R. "Boom in the development of non-peptidic beta-secretase (BACE1) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease." Med.Res.Rev. 29.2 (2009): 295-338.
- Singh, N. A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B. R., Leach, R. J., Melis, R., Ronen, G. M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J. V., McHarg, M. L., Gagnon, D., Rosales, T. O., Peiffer, A., Anderson, V. E., Leppert, M. "A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns." Nat.Genet. 18.1 (1998): 25-29.

- Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaaari, S. M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L., John, V. "Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain." Nature 402.6761 (1999): 537-40.
- Skovronsky, D. M., Pijak, D. S., Doms, R. W., Lee, V. M. "A distinct ER/IC gamma-secretase competes with the proteasome for cleavage of APP." Biochemistry 39.4 (2000): 810-17.
- Splawski, I., Tristani-Firouzi, M., Lehmann, M. H., Sanguinetti, M. C., Keating, M. T. "Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function." Nat.Genet. 17.3 (1997): 338-40.
- Stefansson, H., Steinthorsdottir, V., Thorgeirsson, T. E., Gulcher, J. R., Stefansson, K. "Neuregulin 1 and schizophrenia." Ann.Med. 36.1 (2004): 62-71.
- Suh, B. C. und B. Hille. "Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis." Neuron 35.3 (2002): 507-20.
- Suh, B. C. und B. Hille. "Regulation of KCNQ channels by manipulation of phosphoinositides." J.Physiol. 582.Pt 3 (2007): 911-16.
- Suh, B. C., Horowitz, L. F., Hirdes, W., Mackie, K., Hille, B. "Regulation of KCNQ2/KCNQ3 current by G protein cycling: the kinetics of receptor-mediated signaling by Gq." J.Gen.Physiol. 123.6 (2004): 663-83.
- Sun, D. D., Wang, H. C., Wang, X. B., Luo, Y., Jin, Z. X., Li, Z. C., Li, G. R., Dong, M. Q. "Tanshinone IIA: a new activator of human cardiac KCNQ1/KCNE1 (I(Ks)) potassium channels." Eur.J.Pharmacol. 20;590.1-3 (2008): 317-21.
- Sun, X., He, G., Qing, H., Zhou, W., Dobie, F., Cai, F., Staufenbiel, M., Huang, L. E., Song, W. "Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 103.49 (2006): 18727-32.
- Takumi, T., H. Ohkubo, und S. Nakanishi. "Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current." Science 242.4881 (1988): 1042-45.
- Tawfik, D. S. und A. D. Griffiths. "Man-made cell-like compartments for molecular evolution." Nat.Biotechnol. 16.7 (1998): 652-56.
- Tinel, N., Diochot, S., Lauritzen, I., Barhanin, J., Lazdunski, M., Borsotto, M. "M-type KCNQ2-KCNQ3 potassium channels are modulated by the KCNE2 subunit." FEBS Lett. 480.2-3 (2000): 137-41.
- Tuttle, J. B. und E. Richelson. "Ionic excitation of a clone of mouse neuroblastoma." Brain Res. 84.1 (1975): 129-35.
- Ulbricht, W. "Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation." Physiol. Rev. 85.4 (2005): 1271-301.

- Van, Uden E., Mallory, M., Veinbergs, I., Alford, M., Rockenstein, E., Masliah, E. "Increased extracellular amyloid deposition and neurodegeneration in human amyloid precursor protein transgenic mice deficient in receptor-associated protein." J.Neurosci. 22.21 (2002): 9298-304.
- Varghese, A., Tenbroek, E. M., Coles, J., Jr., Sigg, D. C. "Endogenous channels in HEK cells and potential roles in HCN ionic current measurements." Prog.Biophys.Mol.Biol. 90.1-3 (2006): 26-37.
- Vassar, R. "BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease." J.Mol.Neurosci. 23.1-2 (2004): 105-14.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M. "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." Science 286.5440 (1999): 735-41.
- Vassar, R., Kovacs, D. M., Yan, R., Wong, P. C. "The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential." J.Neurosci. 29.41 (2009): 12787-94.
- von Arnim, C. A., Kinoshita, A., Peltan, I. D., Tangredi, M. M., Herl, L., Lee, B. M., Spoelgen, R., Hsieh, T. T., Ranganathan, S., Battey, F. D., Liu, C. X., Bacskaï, B. J., Sever, S., Irizarry, M. C., Strickland, D. K., Hyman, B. T. "The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate." J.Biol.Chem. 280.18 (2005): 17777-85.
- Wang, H. S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B. S., Wymore, R. S., Cohen, I. S., Dixon, J. E., McKinnon, D. "KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel." Science 282.5395 (1998): 1890-93.
- Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., De Strooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., Haass, C. "Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1." Science 314.5799 (2006): 664-66.
- Wong, H. K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De Strooper, B., Saftig, P., Nukina, N. "beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase." J.Biol.Chem 280.24 (2005): 23009-17.
- Xu, R., Thomas, E. A., Gazina, E. V., Richards, K. L., Quick, M., Wallace, R. H., Harkin, L. A., Heron, S. E., Berkovic, S. F., Scheffer, I. E., Mulley, J. C., Petrou, S. "Generalized epilepsy with febrile seizures plus-associated sodium channel beta1 subunit mutations severely reduce beta subunit-mediated modulation of sodium channel function." Neuroscience 148.1 (2007): 164-74.
- Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., Brashier, J. R., Stratman, N. C., Mathews, W. R., Buhl, A. E., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrikson, R. L., Gurney, M. E. "Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity." Nature 402.6761 (1999): 533-37.

- Yang, L. B., Lindholm, K., Yan, R., Citron, M., Xia, W., Yang, X. L., Beach, T., Sue, L., Wong, P., Price, D., Li, R., Shen, Y. "Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease." Nat.Med. 9.1 (2003): 3-4.
- Younkin, S. G. "The role of A beta 42 in Alzheimer's disease." J.Physiol.Paris 92.3-4 (1998): 289-92.
- Yu, F. H., Westenbroek, R. E., Silos-Santiago, I., McCormick, K. A., Lawson, D., Ge, P., Ferreira, H., Lilly, J., DiStefano, P. S., Catterall, W. A., Scheuer, T., Curtis, R. "Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2." J.Neurosci. 20;23.20 (2003): 7577-85.
- Yu, F. H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. A., Catterall, W. A. "Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily." Pharmacol.Rev. 57.4 (2005): 387-95.
- Yu, S. P. und G. A. Kerchner. "Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells." J.Neurosci.Res. 52.5 (1998): 612-17.
- Yuste, R. und T. Bonhoeffer. "Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies." Nat.Rev.Neurosci. 5.1 (2004): 24-34.
- Zulli, R., Nicosia, F., Borroni, B., Agosti, C., Prometti, P., Donati, P., De Vecchi, M., Romanelli, G., Grassi, V., Padovani, A. "QT dispersion and heart rate variability abnormalities in Alzheimer's disease and in mild cognitive impairment." J.Am.Geriatr.Soc. 53.12 (2005): 2135-39.

## 7. Anhang und Verzeichnisse

### 7.1 Tabellenanhang

Tab.7.1: **Elektrophysiologische Parameter der Aktivierung intrinsischer Natrium-Kanäle von N1E-115-Zellen (N1E-115<sub>nativ</sub>) unter Einfluß der mBACE1.** Signifikanzen in Relation zu N1E-115<sub>nativ</sub>.

Konstrukt	Aktivierung				Stromdichte bei 10mV		
	V <sub>0.5</sub> (mV)	Slope (mV)	n	p	(pA/pF)	n	p
N1E-115 <sub>nativ</sub>	-5.07±1.12	6.35±0.28	12	--	242.96±33.97	12	--
+C3	-10.05±0.6	5.51±0.18	12	0.02	69.66±10.81	14	1.30·e <sup>-7</sup>
+mBACE1	-17.36±1.04	5.16±0.23	21	1.47·e <sup>-10</sup>	88.20±12.50	21	2.84·e <sup>-7</sup>
+mBACE1 +C3	-21.87±1.27	5.07±0.28	10	1.48·e <sup>-12</sup>	43.32±4.32	10	2.01·e <sup>-8</sup>

Tab.7.2: **Elektrophysiologische Parameter der Ströme von hKCNQ2- und hKCNQ3- Mono- oder Heteromeren unter Einfluss der hBACE1 und der hβ2-/hβ4-Untereinheiten von Natriumkanälen in HEK293.** Signifikanzen jeweils in Relation zum den hKCNQ2/3-Heteromeren respektive den hKCNQ2- oder hKCNQ3-Homomeren.

Konstrukt	Aktivierung			
	V <sub>0.5</sub> (mV)	Slope (mV)	n	p
<i>hKCNQ2/3 in HEK293</i>	-20.7±1.2	10.8±0.4	19	--
+hBACE1	-25.2±2.0	9.9±0.2	13	n.s.
+hβ2	-26.9±1.2	10.2±0.2	18	0.044
+hβ2+hBACE1	-19.2±1.9	9.8±0.5	10	n.s.
+hβ2+mBACE1 <sub>D289N</sub>	-17.9±1.8	10.1±0.5	10	n.s.
+hβ2+hBACE1+C3	-28.2±1.1	10.5±0.4	16	0.007
+mβ2-ctf	-19.2±2.0	10.4±0.4	14	n.s.
+mβ2-ntf	-19.3±1.4	10.1±0.5	16	n.s.
+mβ4	-25.1±1.3	10.1±0.3	17	n.s.
+mβ4+hBACE1	-28.0±1.8	10.0±0.3	12	0.028
<i>hKCNQ2 in HEK293</i>	-15.3±0.9	12.6±0.4	10	--
+hβ2	-18.9±2.4	11.9±0.5	9	n.s.
+hβ2+hBACE1	-16.4±2.1	11.9±0.4	7	n.s.
+mβ2-ctf	-16.8±1.1	10.7±0.4	9	n.s.
+mβ2-ntf	-13.6±1.8	12.8±0.4	11	n.s.
<i>hKCNQ3 in HEK293</i>	-34.9±1.2	9.7±0.57	8	--
+hβ2	-32.5±1.3	11.2±0.7	7	n.s.
<i>hKCNQ2/3 in N1E-115</i>	-20.4±2.5	8.9±0.2	3	--
+C3	-24.3±1.2	9.0±0.2	8	n.s.
+C3+hβ2	-25.2±1.4	8.3±0.3	6	n.s.
+hβ2	-18.8±1.4	8.2±0.2	2	n.s.
+hβ2+hBACE1	-21.0±1.4	9.4±0.3	8	n.s.



Tab.7.3: **Synopsis der Zeitkonstanten von KCNQ2/3 unter Einfluss von Na<sub>v</sub>, hβ2, hβ4 und hBACE1.** Signifikanzen jeweils in Relation zum den hKCNQ2/3-Heteromeren. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Potential (mV)	Konstrukte										
	hKCNQ2/3	+hBACE1	+β2	+β2+hBACE1	+β2+hBACE1+C3	+β2 <sub>ntf</sub>	+β2 <sub>ctf</sub>	+β2+mBace <sub>D289N</sub>	+β4	+β4+hBACE1	
<i>t<sub>Akt.</sub></i> (ms)	<i>n</i>	18	18	18	8	15	16	12	6	17	10
0		177.8±10.6	152.1±13.0	173.8±8.5	135.0±11.4	125.9±8.4 <sup>*</sup>	129.3±6.1 <sup>*</sup>	164.1±13.7	201.5±23.5	140.2±8.7	138.5±8.8
+10		149.1±8.6	124.22±9.9	138.7±6.5	110.0±9.3	106.8±7.6 <sup>**</sup>	102.4±4.7 <sup>**</sup>	122.8±8.8	162.2±18.7	115.6±7.0	118.2±8.3
+20		134.9±8.3	104.4±7.7 <sup>*</sup>	118.1±5.6	90.5±7.7 <sup>**</sup>	95.7±6.5 <sup>**</sup>	86.1±4.1 <sup>***</sup>	97.2±6.6 <sup>*</sup>	137.2±14.2	97.0±5.9 <sup>**</sup>	103.3±8.8
+30		124.4±9.1	91.4±6.7 <sup>*</sup>	103.1±5.2	79.9±7.3 <sup>**</sup>	90.4±7.1 <sup>*</sup>	75.6±3.8 <sup>***</sup>	83.7±6.0 <sup>**</sup>	119.7±11.1	88.4±5.9 <sup>**</sup>	94.2±9.9
+40		116.2±8.7	84.0±5.8 <sup>*</sup>	93.0±5.3	72.2±6.5 <sup>**</sup>	79.8±7.8 <sup>**</sup>	64.7±4.0 <sup>***</sup>	73.6±4.7 <sup>**</sup>	105.9±9.3	81.4±6.7 <sup>*</sup>	88.4±11.1
+50		108.9±11.6	77.6±6.0 <sup>*</sup>	87.7±5.3	68.5±6.3 <sup>*</sup>	77.5±10.4	59.6±4.2 <sup>***</sup>	64.2±4.7 <sup>**</sup>	95.7±7.5	70.4±7.5 <sup>*</sup>	69.2±7.6 <sup>*</sup>
<i>t<sub>Deakt.</sub></i> (ms)	<i>n</i>	7	7	7	6	4	6	8	3	6	5
-80		55.1±3.9	57.02±3.53	111.7±23.1 <sup>*</sup>	45.9±7.6	71.6±20.0	38.9±3.2	36.4±5.1	60.4±5.9	47.6±18.2	86.7±18.1
-70		77.7±5.2	80.0±8.8	151.9±27.2 <sup>*</sup>	63.6±11.8	112.8±38.8	56.9±5.0	52.5±8.2	82.0±10.6	68.85±5.4	131.2±31.8
-60		118.15.6	123.1±16.9	205.1±31.7	96.6±19.6	142.4±25.6	85.8±23.6	83.7±14.1	110.9±14.8	104.0±8.0	212.4±50.6
-50		186.9±12.6	174.2±31.2	243.3±21.6	151.8±30.5	195.1±25.7	147.5±26.3	151.4±28.2	169.4±29.5	144.1±9.7	238.8±31.9
-40		252.9±31.0	198.9±38.5	250.0±16.8	210.6±29.4	232.3±27.8	176.6±25.1	200.9±20.0	254.7±44.5	166.7±7.3	204.3±17.6

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	<b>Grad Celsius</b>	EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
K	<i>Grad Kelvin</i>	et al.	<i>et alii (m), et aliae (f)</i>
μ	<i>Mikro (10<sup>-6</sup>)</i>	etc.	<i>et cetera</i>
Ω	<i>Ohm</i>	F	<i>Farad; elektrische Kapazität</i>
2D	<i>Zweidimensional</i>	FCS	<i>fetal calf serum</i>
3D	<i>Dreidimensional</i>	FAD	<i>familiäre Form der AD</i>
A	<i>Ampere</i>	G	<i>Giga [10<sup>9</sup>]</i>
Abb.	<i>Abbildung</i>	g	<i>Erdschwerebeschleunigung [9.81 m/s<sup>2</sup>]</i>
A/D	<i>Analog/Digital</i>	G	<i>Leitfähigkeit (reziproker Widerstand; <math>G=R^{-1}</math>; <math>G=I/U</math>)</i>
AD	<i>Alzheimer Disease</i>	GmbH	<i>Gesellschaft mit beschränkter Haftung</i>
AICD	<i>APP intracellular domain</i>	G-Protein	<i>Guaninnukleotid-bindendes Signalprotein</i>
ADAM10/17	<i>a disintegrin and metalloproteinase domain 10/17</i>	H <sub>2</sub> O	<i>Wasser</i>
APH-1	<i>anterior pharynx-defective 1</i>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<i>Hydrogencarbonat-Ion</i>
APP	<i>amyloid precursor protein</i>	HEK293	<i>human embryonic kidney cells der Zelllinie 293</i>
AS	<i>Aminosäure</i>	HEPES	<i>N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)</i>
Asp2	<i>Aspartylprotease 2 (BACE1)</i>	h	<i>Stunde</i>
Aβ <sub>40/42</sub>	<i>Amyloidpeptid aus 40/42 AS</i>	Hz	<i>Hertz [s<sup>-1</sup>]</i>
ATP	<i>Adenosin-Tri-Phosphat</i>	I	<i>Strom [A]</i>
BACE1	<i>β-site-APP-cleaving enzyme1</i>	IFM	<i>Inaktivierungssegment des Natriumkanals; bestehend aus den Aminosäuren Iso-leucin (I), Phenylalanin (F), und Methionin (M)</i>
bzw.	<i>Beziehungsweise</i>	Iso-K <sup>+</sup> -Lösung	<i>annähernd isoosmotische, interne Kaliumlösung</i>
C3	<i>Compound 3 (BACE1-Inhibitor)</i>	IUPHAR	<i>International Union of Pharmacology</i>
C83/C99	<i>APP-Spaltprodukte</i>	K <sup>+</sup>	<i>Kaliumion</i>
ca.	<i>circa</i>	K	<i>Kilo (10<sup>3</sup>)</i>
CaCl <sub>2</sub>	<i>Calciumchlorid</i>	Kb	<i>Kilo-Basenpaare</i>
CCD-Kamera	<i>charge couple device-Kamera</i>	k-factor	<i>slope factor; Steilheitsfaktor</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>	KCl	<i>Kaliumchlorid</i>
cm	<i>Zentimeter</i>	KCNE	<i>β-Untereinheit spannungsgesteuerter K<sub>v</sub>-Kanäle</i>
CO <sub>2</sub>	<i>Kohlenstoffdioxid</i>	KCNQ	<i>K<sup>+</sup>-Channel, Long QT-Syndrom assoziiert; α-Untereinheit spannungsgesteuerter K<sub>v</sub>-Kanäle (K<sub>v</sub>7)</i>
CTF	<i>C-terminales Fragment</i>	kDa	<i>Kilo Dalton</i>
D289N	<i>katalytisch inaktive BACE1-Mutante (BACE1<sub>D289N</sub>)</i>	KOH	<i>Kaliumhydroxid</i>
d	<i>Tag</i>	K <sub>v</sub>	<i>voltage gated K<sup>+</sup>-channel</i>
d.h.	<i>das heißt</i>		
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>		
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>		
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>		
E.coli	<i>Escherichia coli, Bakterium</i>		
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>		
EGTA	<i>Ethylene glycol bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic-acid</i>		

	(K <sub>v</sub> 7= KCNQ)
<b>LB-Medium</b>	<i>lysogeny broth, Medium</i>
<b>LED</b>	<i>light emitting diode</i>
<b>L</b>	<i>Liter</i>
<b>µg</b>	<i>Mikrogramm</i>
<b>µl</b>	<i>Mikroliter</i>
<b>µm</b>	<i>Mikrometer</i>
<b>m<sup>2</sup></b>	<i>Quadratmeter</i>
<b>m</b>	<i>Meter</i>
<b>m</b>	<i>Milli (10<sup>-3</sup>)</i>
<b>M</b>	<i>Mega (10<sup>6</sup>)</i>
<b>M</b>	<i>Mol, molar</i>
<b>mA</b>	<i>Milliampere</i>
<b>mg</b>	<i>Milligramm</i>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<i>Magnesiumchlorid</i>
<b>min</b>	<i>Minute</i>
<b>ml</b>	<i>Milliliter</i>
<b>mm</b>	<i>Millimeter</i>
<b>mMol</b>	<i>Millimol</i>
<b>MΩ</b>	<i>Megaohm</i>
<b>ms</b>	<i>Millisekunde</i>
<b>mV</b>	<i>Millivolt</i>
<b>N1E-115</b>	<i>Neuroblastomzelllinie</i>
<b>n</b>	<i>Anzahl</i>
<b>n</b>	<i>Nano (10<sup>-9</sup>)</i>
<b>nm</b>	<i>Nanometer</i>
<b>NMDA</b>	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
<b>NO</b>	<i>Stickstoffmonoxid</i>
	<i>N-terminales Fragment mit</i>
<b>NTF</b>	<i>protonierter Aminogruppe</i>
	<i>(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)</i>
<b>Na<sup>+</sup></b>	<i>Natriumion</i>
<b>NaCl</b>	<i>Natriumchlorid</i>
<b>NaOH</b>	<i>Natriumhydroxid</i>
	<i>α-/β- Untereinheiten (Sub-</i>
<b>Na<sub>v</sub> α/β</b>	<i>units) spannungsgesteuerter</i>
	<i>(voltage gated) Na<sup>+</sup>-Kanäle</i>
<b>Ohm'sches</b>	
<b>Gesetz</b>	<i>R=U/I [V/A; Ω]</i>
<b>OPA</b>	<i>operational amplifizier</i>
<b>P6</b>	<i>APP-Spaltprodukt</i>
<b>p</b>	<i>Pico (10<sup>-12</sup>)</i>
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>PC</b>	<i>personal computer</i>
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i>
<b>PEN-2</b>	<i>presenilin enhancer 2</i>
<b>pF</b>	<i>Picofarad</i>
	<i>potentia Hydrogenii (neg.</i>
<b>pH</b>	<i>dekadischer Logarithmus</i>
	<i>der H<sup>+</sup>-Ionenaktivität)</i>
<b>PS-</b>	<i>Penicillin-Streptomycin-</i>
<b>Gemisch</b>	<i>Gemisch</i>

<b>PS</b>	<i>Presenilin</i>
<b>RC-Glied</b>	<i>Widerstands-Kondensator-</i>
	<i>Glied</i>
<b>RMP</b>	<i>Ruhemembranpotential</i>
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i>
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>R</b>	<i>resistance, elektrischer</i>
	<i>Widerstand [Ω]</i>
<b>s.</b>	<i>siehe</i>
<b>s</b>	<i>Sekunde</i>
<b>SAD</b>	<i>sporadische Form der AD</i>
<b>s.o.</b>	<i>siehe oben</i>
<b>s.u.</b>	<i>siehe unten</i>
<b>Tab.</b>	<i>Tabelle</i>
<b>TACE</b>	<i>tumor-necrosis-factor-α-</i>
	<i>converting enzyme</i>
<b>TEA</b>	<i>Tetraethylammonium</i>
<b>TTX</b>	<i>Tetrodotoxin</i>
<b>u.a.</b>	<i>unter anderem</i>
<b>USA</b>	<i>United States of America</i>
<b>usw.</b>	<i>und so weiter</i>
<b>UV</b>	<i>ultraviolett</i>
<b>V (U)</b>	<i>Voltage, Spannung</i>
<b>vgl.</b>	<i>Vergleiche</i>
<b>V<sub>0.5</sub></b>	<i>Potential halbmaximaler De-</i>
	<i>/Aktivierung (n.Boltzmann)</i>
<b>vs.</b>	<i>versus, „gegenübergestellt“</i>
<b>w.c.</b>	<i>whole cell</i>
<b>z.B.</b>	<i>zum Beispiel</i>
<b>ZNS</b>	<i>zentrales Nervensystem</i>
<b>z.T.</b>	<i>zum Teil</i>
<b>λ</b>	<i>Lambda; Wellenlänge [nm]</i>
<b>T</b>	<i>Tau; Zeitkonstante [s]</i>

### 7.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Alzheimer. Angefangen bei der Ermöglichung dieser hochspannenden Arbeit über seine Geduld, seinen großen Wissensfundus und all den fruchtbaren Diskussionen war er mir ein wertvoller Mentor, der mir die allerbesten Bedingungen zum Forschen und Verfassen dieser Arbeit bot. Nicht zuletzt sei ihm auch ob der vielen Freiheiten gedankt, die er mir hinsichtlich der thematischen Mitgestaltung dieser Arbeit ließ.

Dr. Tobias Huth danke ich für die über alle Maßen kompetente und engagierte Betreuung meiner Arbeit, für die vielen lehrreichen und interessanten Diskussionen und dafür, dass er stets ein offenes Ohr für seine Doktoranden hat. Sein Sachverstand in Verbindung mit seiner Begeisterung für die Forschung brachte mir die Wissenschaft näher und war mir allzu oft eine grosse Motivation. Ohne ihn wäre eine Doktorarbeit dieser Form nicht möglich gewesen.

Prof. Dr. Paul Saftig, PD Dr. Michael Schwake, Prof. Dr. Karina Reiss und Dr. Andrea Rittger aus dem Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität Kiel sei für die wertvolle Kooperation gedankt.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden des Physiologischen Instituts der CAU Kiel danke ich für die gemeinsame Zeit, insbesondere gilt dies für Phillip Bergmann, Katja Lammert, Angelika Klose, Meike Völkel, Kati Chammas, Karoline Schmidt-Neuenfeldt, Nils Jansen, Kerstin Kronenbitter, Didier Gremelle, Gabriele Ach, Christoph Richter, Dr. Harald Wiese, Prof. Dr. Markus Bleich, Prof. Dr. Werner Ulbricht, Martin Müller, Werner Kosellek, Dieter Schnell, Ingo Klein und Bernd Müller.

Für eine Gastfreundschaft, die ihres Gleichen sucht und für ein zweites Zuhause zum Wohlfühlen bin ich der „Erlanger-Crew“ zu großem Dank verpflichtet. Neben vielen Anderen gilt mein besonderer Dank: Andrea Link, Oana Covasala, Dr. Fang Zheng, Dr. Roberto de Col, Esther und Miriam Eberhardt, Uwe Nesnidal, PD Dr. Katharina Zimmermann, Dr. Heidi Koegel, PD Dr. Barbara Nixdorf Bergweiler, Sören Stirn, Marianne Agsten, Theresa Schuy, Dr. Peter Linz, Dr. Matthias Engel, Dr. Katrin Kistner, Helena Crescentia, Christiane Reinwald, Rainer Fischer, Iwona Izydorczyk, Wolfgang Schösser, Gerald Kramp, Prof. Dr. Karl-Heinz Plattig, Prof. Dr. Peter Reeh, Prof. Dr. Clemens Forster und Prof. Dr. Karl Messlinger.

Dr. Angelika Lampert war mir sowohl freundschaftlich als auch fachlich eine wertvolle und unvergessene Wegbegleiterin. Nicht zuletzt gilt ihr ein besonderes Dankeschön für die diversen Ablenkungen vom Doktorandenalltag und für das engagierte Korrekturlesen dieser Arbeit. Auch Cornelia Zeitler sei an dieser Stelle herzlich für das fleissige Korrekturlesen gedankt.

Clemens Werner danke ich für die hilfreichen Ratschläge bezüglich kniffliger EDV/Formatierungs-Fragen.

Zu guter Letzt sei meinen Eltern und meinem Bruder gedankt, die mich fortwährend unterstützen.

## 7.4 Lebenslauf

### Ausbildung

<i>07/2009</i>	Approbation als Arzt
<i>06/2009</i>	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung/Staatsexamen
<i>08/2004</i>	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung/Physikum
<i>10/2002</i>	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
<i>06/2001</i>	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

### Praktische Erfahrung

<i>09/2009 – 05/2010</i>	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Physiologie und Pathophysiologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. C. Alzheimer
--------------------------	--

### Praktisches Jahr

<i>04/2008 – 07/2008</i>	Pädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel
<i>12/2007 – 04/2008</i>	Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus, Kiel
<i>08/2007 – 12/2007</i>	Chirurgie, Pretoria Academic Hospital, Pretoria, Südafrika

### Promotion

<i>seit 12/2005</i>	Promotionsarbeit am Physiologischen Institut der CAU Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Alzheimer
---------------------	---

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Ausarbeitung hat noch keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Matthias Nissen